



Centro de Bioplantitas

Tecnologías para la Agricultura Moderna

**UNIVERSIDAD DE CIEGO DE AVILA
CENTRO DE BIOPLANTAS**



**Organogénesis y embriogénesis somática *in vitro* en el guayabo (*Psidium guajava* L.)
cv. Enana Roja Cubana.**

**Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Agrícolas**

OSCAR VITALIO CONCEPCIÓN LAFFITTE

Ciego de Ávila 2007



**UNIVERSIDAD DE CIEGO DE AVILA
CENTRO DE BIOPLANTAS**



**Organogénesis y embriogénesis somática *in vitro* en el guayabo
(*Psidium guajava* L.) cv. Enana Roja Cubana.**

**Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Agrícolas**

Autor: Ing. Oscar Vitalio Concepción Laffitte

Tutor: Dr. Reinaldo Trujillo Sánchez

Ciego de Avila, 2007

... A mis padres
A mis hijos Oscar y Ernesto
A mi familia ...

AGRADECIMIENTOS

A Luly por estar junto a mí en todos los momentos de la vida y brindarme su apoyo. Por ser el alma de este trabajo.

A mis hijos Oscar y Ernesto por ser la fuente principal de mi felicidad.

A Trujillo (el viejo) por Tutor y amigo, motor impulsor de mi formación durante todos estos años de trabajo.

Al los Dres., Ramiro Castillo, José C. Lorenzo y Marcos Martínez por la revisión detallada del documento durante las etapas iniciales del proceso.

A los miembros del Consejo Científico del Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, en especial al Dr. Narciso N. Rodríguez, por aceptar la presentación de los resultados y por sus oportunos señalamientos.

Al Dr. Rafael Gómez Kosky y a la Dra. María Ester González (Chiqui) por las excelentes oponencias y revisión detallada del documento en pre-defensa.

A la Dra. Maritza Escalona por todo el apoyo brindado y transmitirme su optimismo.

Al Dr. Justo González por su ayuda en las secciones de aclimatización y por aceptarme en el grupo estudiantil de biotecnología vegetal. El embrión de toda mi formación profesional.

Al Dr. Ramón Santos por todo el apoyo brindado en la realización de este trabajo.

Al Laboratorio de Ingeniería Metabólica por todo el trabajo en las determinaciones de los fenoles y en los análisis bromatológicos, en especial a Martha, Aurora y Carol.

A mi colectivo, el Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos: Mariela, Liuba, Iris, Yarianne, Yunia, Nadina, Marcos D., Fernando, Carlos A., Romelio y Danilo, junto a los cuales me he formado desde estudiante, gracias por su confianza y ayuda.

A TODOS y a cada uno, de los que de una u otra forma han colaborado con la realización de este trabajo.

¡¡MUCHAS GRACIAS!!

SINTESIS

El presente estudio se realizó en el Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Avila, entre Enero/2001 y Mayo/2006, con el objetivo de desarrollar en el guayabo (*Psidium guajava* L.) cv. Enana Roja Cubana un protocolo de organogénesis a partir de yemas de plantas de campo y un procedimiento de embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos. Los mejores resultados se alcanzaron al emplear yemas de brotes de la raíz de árboles de campo, que mostraron el menor contenido de compuestos fenólicos totales y lograron los mejores resultados en el establecimiento. La multiplicación por segmentos nodales y ramificación axilar, así como el enraizamiento *in vitro* con una adecuada conexión vascular tallo-raíz y la aclimatación *ex vitro* con altos índices de supervivencia, permitieron una buena eficiencia en la propagación. En el primer año de plantadas en campo, las vitroplantas no mostraron variaciones fenotípicas significativas en comparación con plantas procedentes de estacas enraizadas para descriptores de crecimiento del árbol y de calidad del fruto. Para las variables reproductivas, las vitroplantas mostraron un retraso de 10-12 meses y un menor rendimiento promedio por árbol. Adicionalmente se implementó un procedimiento de embriogénesis somática, que contempla la inducción y proliferación del tejido o callo con estructuras embriogénicas a partir de embriones cigóticos inmaduros extraídos de frutos de 45 d de edad en presencia de 2,4-D. La histodiferenciación de los embriones somáticos mejoró significativamente en presencia de sacarosa 60.0 g.L⁻¹ y ABA 15.0-20.0 μmol.L⁻¹. El uso del medio líquido y el cribado de las suspensiones celulares heterogéneas en tamices de 250-1000 μm, permitieron incrementar los rendimientos y la calidad de la histodiferenciación, con un efecto positivo sobre la germinación *in vitro* normal y el porcentaje de conversión en planta.

1. INTRODUCCION

El guayabo (*Psidium guajava* L.) se considera uno de los frutales tropicales de mayor importancia, entre otras cosas, por el alto valor nutricional e industrial de sus frutos (Medina y Pagano, 2003), el uso medicinal de sus compuestos (Jaiarj *et al.*, 1999; Lozoya *et al.*, 2002) y la creciente demanda en mercados nacionales e internacionales (Pages, 2004; FAO, 2005). Su cultivo se realiza con una amplia distribución que abarca diversas regiones tropicales y subtropicales (Pontikis, 1996).

En Cuba, luego de un período de crisis económica que afectó la producción frutícola en general en la pasada década, la producción nacional de guayabas se ha visto nuevamente reanimada (Pages, 2004). En esta etapa, especial demanda ha adquirido el cultivar Enana Roja Cubana, genotipo obtenido en la isla por selección en la década del 60 y caracterizado por un porte bajo, precocidad reproductiva y altos rendimientos (González *et al.*, 1996; Peña *et al.*, 1996).

A pesar de lo anterior, existen numerosos problemas que afectan el cultivo del guayabo desde diferentes perspectivas. Sobresale una alta incidencia de plagas y enfermedades, entre las que se destacan las moscas fruteras y los nemátodos agalladores de las raíces (Peña *et al.*, 1996). Otro de los problemas más importantes se relaciona con la rápida maduración del fruto, que trae consigo dificultades en la cosecha, almacenamiento y transportación de la fruta fresca a áreas urbanas, así como limitaciones en las exportaciones de este tipo de producto (McGuire y Hallman, 1995).

Por esas razones, se dedican recursos al desarrollo de programas de mejoramiento genético y manejo de germoplasma en esta especie (Subramanyan e Iyer, 1993; Rodríguez *et al.*, 2005c; Baptista *et al.*, 2006). Sin embargo, estos trabajos resultan complejos y prolongados (Pontikis, 1996), y contemplan riesgos de portar y diseminar enfermedades (Lozoya-Saldaña, 2001), especialmente en el intercambio de germoplasma, que es necesario para ampliar las bases genéticas (Rodríguez *et al.*, 2005a). Los métodos de propagación convencional para estas aplicaciones presentan algunas limitaciones, a pesar de sus favorables resultados a nivel nacional en la propagación a escala comercial (Farrés y Peña, 2001).

En este contexto, las técnicas biotecnológicas, y en particular aquellas concernientes a la regeneración *in vitro* de plantas completas, constituyen vías alternativas de propagación que pueden complementar satisfactoriamente los métodos convencionales (Pontikis, 1996). Además, permitirían abordar con mayor efectividad los programas de mejoramiento, conservación e intercambio seguro de germoplasma en esta especie.

Escasos trabajos se han publicado con relación al uso de la biotecnología en el *P. guajava* L. La mayoría de éstos, estuvieron dirigidos a desarrollar procedimientos para la propagación *in vitro*, utilizando como vía morfogénica fundamental la organogénesis a partir de yemas vegetativas (Jaiswal y Amin, 1987; Amin y Jaiswal, 1987, 1988; Loh y Rao, 1989; Papadatou *et al.*, 1990; Mohamed-Yasseen *et al.*, 1995; León *et al.*, 1997; Ramírez y Salazar, 1997; Singh *et al.*, 2001; Ali *et al.*, 2003). Por lo general, el establecimiento *in vitro* se manifestó como la fase más crítica de todo el proceso, con altos índices de contaminación y fenolización, que constituyeron barreras biológicas difíciles de superar (Khattak *et al.*, 1990; Siddiqui y Farooq, 1996; Ramírez *et al.*, 1999a). Por esa razón, numerosos protocolos acudieron al material juvenil procedente de semillas germinadas (Loh y Rao, 1989; Papadatou *et al.*, 1990; Mohamed-Yasseen *et al.*, 1995; Ali *et al.*, 2003).

En Cuba, el uso de material juvenil de semillas, permitió establecer vías alternativas para la propagación de esta especie (Pérez *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2006) y abrió nuevas perspectivas para el mejoramiento genético y el manejo de germoplasma (Collado *et al.*, 2002). No obstante, aún no se ha logrado el establecimiento *in vitro* de genotipos elites identificados directamente en el campo, debido a dificultades con la contaminación, fenolización y capacidad de brotación de los explantes. Por tanto, superar esas barreras constituye una necesidad para continuar avanzando en la aplicación de las técnicas biotecnológicas en este cultivo. Adicionalmente, también es posible profundizar en algunos aspectos relacionados con el procedimiento general.

Las dificultades en las aplicaciones de los métodos convencionales de propagación también conllevaron al desarrollo de métodos de regeneración de plantas más eficientes como la embriogénesis somática *in vitro*. Sin embargo, los trabajos publicados sobre el tema son muy escasos (Ramírez y Salazar, 1998b; Akhtar *et al.*, 2000; Chandra *et al.*, 2004) y generalmente estuvieron dirigidos a evaluar el tipo de explante y las condiciones de cultivo. Con frecuencia se compararon diferentes reguladores del crecimiento y medios de cultivo para la inducción de callos con estructuras embriogénicas (Ramírez y Salazar, 1998b, Vilchez *et al.*, 2002; Chandra *et al.*, 2004). En estos estudios se reconoció al embrión cigótico como el explante de mejor respuesta y se planteó que el desarrollo del embrión somático es continuo y asincrónico a partir de su formación (Akhtar *et al.*, 2000).

Las experiencias en Cuba también abordan las fases de proliferación por embriogénesis secundaria, la germinación *in vitro* y la aclimatización de las plántulas regeneradas (Vilchez *et al.*, 2002, 2004), y en ocasiones se obtuvieron resultados muy satisfactorios (Gómez-Kosky *et al.*, 2005). No obstante,

en estos trabajos se hace poco énfasis o no se evalúan otros aspectos relacionados con el uso de reguladores del crecimiento y medios de cultivo líquido para mejorar la calidad del proceso de histodiferenciación, así como las consecuencias de esos tratamientos en la germinación y conversión en planta de los embriones somáticos de guayabo. Adicionalmente, los trabajos publicados carecen de evidencias histológicas que demuestren el origen de las estructuras, describan las fases del proceso y las etapas de desarrollo por la cual transitan los embriones somáticos.

De acuerdo a todo lo planteado anteriormente, la hipótesis a comprobar en este trabajo es que:

Para el guayabo cv. Enana Roja Cubana, si se determinan el material vegetal y las condiciones de cultivo in vitro apropiadas para los procesos de organogénesis y embriogénesis somática, es posible la regeneración de plantas completas.

Para dar cumplimiento a esta hipótesis se trazaron los siguientes objetivos:

1. *Establecer un protocolo de organogénesis a partir de yemas de árboles de campo de guayabo.*
2. *Implementar un procedimiento de embriogénesis somática, a partir de embriones cigóticos de guayabo.*

Novedad Científica.

Por primera vez, para el *P. guajava* L. en general y para el cultivar Enana Roja Cubana en particular, se estableció un protocolo de regeneración y propagación vía organogénesis *in vitro*, que utiliza yemas de brotes de las raíces de los árboles de campo y se basa en fundamentos topofísicos de selección del explante. Del mismo modo, se implementó un procedimiento de embriogénesis somática con un uso efectivo del medio líquido para promover un proceso de histodiferenciación de alta frecuencia, con embriones somáticos de calidad para lograr la germinación *in vitro* y altos índices de conversión en planta. Además se ofrece un estudio histológico que permite una mayor comprensión del proceso.

Valor Práctico.

Se logró el establecimiento de un protocolo de organogénesis que permite la propagación *in vitro* del guayabo cv. Enana Roja Cubana, utilizando yemas de brotes de la raíz de árboles de campo, el cual permitió superar las barreras biológicas que limitaban el desarrollo *in vitro* de los explantes y

posibilitó la verdadera clonación. Adicionalmente se proporcionó una herramienta que permite en lo adelante abordar con mayor efectividad, programas de mejoramiento y manejo de germoplasma, que involucren al cultivar de guayabo de mayor impacto a nivel nacional. Estas herramientas son utilizadas en centros de investigación de biotecnología agrícola o vegetal, en Cuba y en el extranjero.

REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Aspectos generales del cultivo del guayabo (*P. guajava* L.).

En la familia *Myrtaceae*, la cual cuenta con más de 3800 especies distribuidas en aproximadamente 133 géneros (Wilson *et al.*, 2001; Sytsma y Litt, 2002), pocas especies producen frutos comestibles. El guayabo (*Psidium guajava* L.) es una de ellas, y constituye la más valiosa de todas las del género (Cañizarez, 1968; Peña *et al.*, 1996).

2.1.1 Origen, distribución e importancia del guayabo.

El guayabo es un árbol frutal oriundo de América Tropical y su centro de origen se ubica en un punto situado entre México y Perú. Su primer registro data de 1526 cuando el español Gonzalo Fernández de Oviedo y Valdez reconoció a esta planta como guayabo y a su fruta como guayaba, empleando los vocablos con que los indígenas antillanos la denominaban (Cañizares, 1968). A partir de su descubrimiento su distribución se agilizó de manera extraordinaria. En la actualidad es un árbol que se encuentra naturalizado en todas las zonas tropicales y subtropicales del planeta (Peña *et al.*, 1996).

El guayabo posee importancia tanto para el comercio mundial como para la economía doméstica (Yadava, 1994). Esto se debe al alto valor nutricional de sus frutos, los cuales tienen disímiles usos en la alimentación humana como fruta fresca o industrializada en forma de pastas, jaleas, "cascos", mermeladas y jugos (Cañizares, 1968; Peña *et al.*, 1996). Además, debido a las propiedades antimicrobiana y astringente de sus compuestos (Jaiarj *et al.*, 1999; Abdelrahim *et al.*, 2002) suele ser utilizada en la medicina para tratar gastroenteritis, diarreas y disenterías (Lozoya *et al.*, 2002); también, para reducir la tensión arterial, disminuir los niveles de colesterol y de triacilglicéridos en sangre (Singh *et al.*, 1992), lo cual ha brindado la posibilidad de que se confeccionen algunos fármacos de importancia (Gutiérrez *et al.*, 2000).

Las propiedades de la fruta hacen al cultivo del guayabo mucho más interesante, pues se trata de una de las mejores fuentes de vitamina C, minerales y fibras que existe en la naturaleza (Jiménez-Escrig *et al.*, 2001). De esta forma ayuda a prevenir el cáncer, los trastornos cardiovasculares, la hipertensión arterial, y tiene un reconocido efecto sobre el sistema digestivo e inmunitario ya que obra contra el envejecimiento por su efecto antioxidante (Pumar y Cabrera, 2003).

2.1.2 Características botánicas del guayabo en general y del cultivar Enana Roja Cubana en particular.

El guayabo es un árbol de porte bajo y con mucho follaje, que alcanza entre dos y nueve metros de altura, y su tronco llega hasta 30 cm de diámetro. Las hojas son coriáceas, generalmente oblongas o elípticas, pubescentes, dispuestas en pares alternos a lo largo de las ramas. Las flores son hermafroditas, presentan una corola formada por cuatro-cinco pétalos de color blanco. El cáliz es cerrado en botón y tiene de cuatro a cinco sépalos. El androceo posee numerosos estambres de color blanco cremoso con anteras ovales y prolíferas en polen. El gineceo presenta un solo pistilo con ovario ínfero. Las flores son solitarias o agrupadas y brotan de yemas situadas en las axilas de las hojas. El fruto está clasificado como una baya y puede tener forma variada con un peso promedio entre 15 y 460 g. El contenido de semillas es variable y en algunos casos sobrepasa el 2% del peso total del fruto (Cañizares, 1968; Peña *et al.*, 1996).

Las características internas y externas de los frutos son de extraordinaria importancia en la selección de una variedad. Al respecto, la guía para Conducir Test de Distinción, Homogeneidad y Estabilidad (UPOV) en el guayabo, relaciona cinco características de los frutos como primordiales para agrupar variedades. El relieve de la superficie o piel, el cual puede ser liso, rugoso o irregular. El color de la piel, que varía con la madurez del fruto y va desde el verde-amarillo pálido al rojo, pasando por diferentes tonos de amarillo y naranja. El color del mesocarpio o pulpa, que va desde el blanco hasta el rosado intenso y el naranja. La forma del extremo peduncular que puede ser desde redondeado hasta truncado o aguzado, así como el ancho de ese extremo en relación con el fruto (UPOV, 1987).

El cultivar en estudio, la Enana Roja Cubana, se trata de un árbol de porte pequeño, como su nombre lo indica, con un follaje denso, ramas extendidas y con hábito de crecimiento disperso. Tiene una copa de hasta 3 m de diámetro y una altura promedio de aproximadamente 2.7 m a los 5 años de edad. Es muy prolífero y la producción de frutos se inicia antes de los 6 meses de injertado. El fruto es de mediano a grande y de forma ovoide. Es un genotipo muy productivo y se señalan rendimientos de cerca de 100 ton/ha en plantaciones de 4 años de edad, bajo cultivo intensivo con marco de plantación de 4.5 m x 1.5 m, en condiciones experimentales (González *et al.*, 1996; Peña *et al.*, 1996).

2.1.3 Principales países productores de guayaba y producción en Cuba.

La guayaba a pesar de no estar en la cumbre de las frutas tropicales en cuanto a niveles de producción, sí goza de un gran prestigio a nivel mundial (FAO, 2005). Los principales países productores en la actualidad son: India, China, México, Indonesia, Tailandia, Pakistán, Filipinas, Brasil, Nigeria y Egipto (FAOSTAT, 2006).

En Cuba, su cultivo aumentó notablemente a partir de 1959 y en 1991 se alcanzó una producción record de 35 000 toneladas (Peña *et al.*, 1996). Este incremento se vio limitado tras la crisis económica de la pasada década, la cual afectó la producción frutícola nacional en sentido general (Pages, 2004). Sin embargo, en la actualidad la producción se ha reanimado, superando las cifras alcanzadas anteriormente (Figura 1).

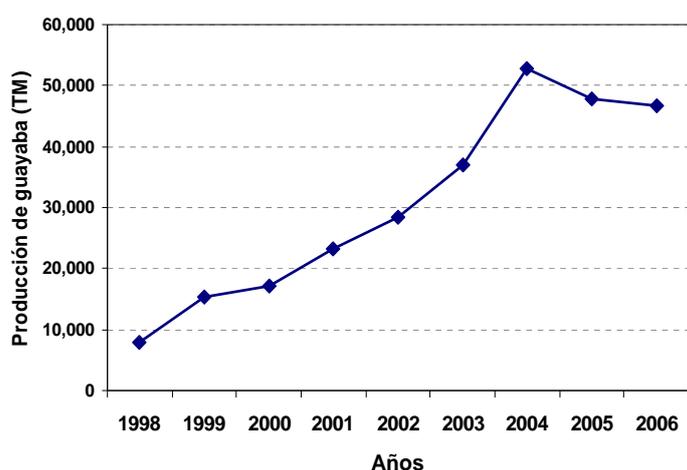


Figura 1. Producción nacional de guayaba, durante el período 1998–2006. Los valores están expresados en toneladas métricas (Fuente: MINAG, 2006).

En el país existen numerosos cultivares comerciales de importancia. En los últimos años se ha hecho mayor énfasis en incrementar los genotipos de porte bajo. Justamente, la de mayor importancia es la Enana Roja Cubana, también conocida como EEA 18-40, la cual se obtuvo por selección en la década del 60 en la Estación Experimental Agronómica (EEA) de Santiago de las Vegas (Peña *et al.*, 1996).

Las ventajas que ofrece este cultivar, relacionadas con su porte bajo, precocidad reproductiva, alto rendimiento y calidad del fruto, han provocado que tanto los productores privados como las cooperativas y granjas estatales la prefieran. Tal distinción, trae consigo una amplia distribución nacional que ocupa más del 52% del área total dedicada al cultivo y una contribución del 84% de la cosecha (Pages, 2004). Por esa razón, varios grupos nacionales de investigación priorizan el desarrollo de nuevos proyectos en este cultivar promisorio, sobre todo aquellos relacionados con su propagación y mejora genética.

2.2 Métodos de propagación convencional utilizados en el guayabo (*P. guajava* L.).

2.2.1 Principales métodos de propagación convencional en el guayabo.

El modo de propagación natural del guayabo es por semilla, razón por la cual, a través de miles de generaciones se acumuló en su potencial un infinito número de formas, tamaños, colores, estructura y otras características que le confieren rusticidad y adaptabilidad en disímiles grados (Tong *et al.*, 1991). Las semillas se mantienen viables por varios meses, a menudo germinan en 2 o 3 semanas, pero en ocasiones puede tomar hasta 8 semanas. Algunos autores, para lograr altos porcentajes de germinación (+ 90%) en el menor tiempo, sugieren sumergir las semillas durante 4 d en agua destilada, seguido de 24 h en una solución de GA₃ 1000 ppm (Rodríguez *et al.*, 1983). Otros plantean que pre-tratamientos con ácido sulfúrico, o hervirlas por 5 min, o remojarlas por 2 semanas acelera el proceso de germinación (Aguilera, 2001). Por lo general, las semillas son monoembriónicas y se conoce que poseen hasta un 30% de variabilidad genética, aspecto que las limita como método de propagación clonal masivo (Pontikis, 1996). No obstante, a través de éstas se produce el material vegetal que se utiliza como patrón o porta-injertos (Peña *et al.*, 1996).

En la propagación asexual o vegetativa del guayabo, los métodos más empleados son el injerto, la estaca, y en menor cuantía, el acodo (Cañizares, 1968; Peña *et al.*, 1996). Sobre el primero, se utilizan diferentes tipos. En Cuba se conocen los injertos de yema en escudete con y sin madera, y el de corona. Los mejores resultados se obtuvieron con el de yema en chapa (Peña *et al.*, 1996). En estudios realizados en el municipio del Zulia en Venezuela, se utilizaron otros métodos de injerto entre los que se destacan el de cuña lateral y enchape lateral (Ramírez *et al.*, 1999b). Como patrones de especies afines se han utilizado: *P. friedrichsthalianum* (Niedenzu), *P. cattleianum sabine* y *P. molle bertol* (Niedenzu). El patrón cas (*P. friedrichsthalianum*) fue el más resistente, por lo que se considera un genotipo promisorio para ser utilizado en campos infestados con *Meloidogyne incognita* raza 1 (Cassasa *et al.*, 1997). En Cuba los mejores resultados se obtienen con la forma rústica del *P. guajava* L. conocida como 'Cotorrera' o 'Criolla' (González y Sourd, 1985), genotipo que aunque es muy rústico no es resistente a los nemátodos (Rodríguez *et al.*, 2006).

En la propagación por estacas solo es necesario que se desarrolle un nuevo sistema de raíces adventicias, debido a que la estaca posee yemas con aptitud potencial para desarrollar nuevos vástagos (Khattak *et al.*, 2001). En Cuba, este método goza de una amplia distribución en su aplicación para la propagación comercial del guayabo y los resultados han sido satisfactorios a nivel nacional (Farrés y Peña, 2001). El uso de reguladores del crecimiento con el fin de inducir el

enraizamiento de esquejes es la principal práctica. Los estudios en este campo han conllevado incluso al uso de algunos bioestimulantes de producción nacional, como el Biobras-16, el Pectimorf y el Rizobac, con el fin de mejorar dicho proceso (Ramírez *et al.*, 2003). No obstante, éste es afectado por la fenolización y la acción de microorganismos patógenos, lo cual trae consigo en algunos casos porcentajes de supervivencia bajos (Ramírez *et al.*, 1999b). Además, se conoce que este método promueve con el paso del tiempo un envejecimiento ontogenético de los propágulos y conlleva a una importante afectación de su vigor (Rodríguez *et al.*, 2005a).

En sentido general en los métodos convencionales o de macropropagación del guayabo se reconoce que existe una marcada incidencia de las condiciones ambientales y de época del año (Kattak *et al.*, 2001). Este aspecto, junto a otros, crea determinadas limitaciones a la hora de abordar otras aplicaciones que no son precisamente de propagación vegetativa.

2.2.2 Limitaciones frecuentes de los métodos de propagación convencional para otras aplicaciones en el cultivo del guayabo.

En el guayabo, los métodos convencionales de propagación presentan inconvenientes para otras aplicaciones como el mejoramiento genético y la conservación e intercambio seguro de germoplasma. De acuerdo con Pontikis (1996), la posibilidad de obtener cultivares superiores en el guayabo por medio de cruzamientos y selecciones repetidas resulta complejo y prolongado, debido al alto grado de heterocigocidad y al largo período juvenil, lo cual requiere un número variado de generaciones para lograr una pequeña ganancia genética. Este autor también refiere que las flores, con estructura bisexual de numerosos estambres y carpelos protegidos, son difíciles de emascular y polinizar artificialmente. A esto hay que añadir que horas antes de la apertura floral (antesis) ocurre un proceso de auto-polinización, fenómeno incontrolado en la biología floral del guayabo (Caraballo, 2001). Estos aspectos obstaculizan el mejoramiento genético. Por esa razón el método más utilizado es la selección basada en características hortícolas promisorias de plantas propagadas por semillas, que luego son clonadas a través de injertos o estacas enraizadas. La mayoría de los cultivares comerciales de mayor demanda en el mundo, provienen de esta vía (Pontikis, 1996).

También se presentan limitaciones relacionadas con el número de esquejes o vástagos que puede proveer un individuo elite o superior, que se ha obtenido y seleccionado previamente (Peña *et al.*, 1996). Este aspecto hace más lenta la introducción de nuevos cultivares a escalas productivas.

Con relación al intercambio de germoplasma, cuando se utilizan propágulos de métodos convencionales, se está sujeto a un riesgo mayor de portar y diseminar enfermedades. Este problema se reconoce para muchas especies de plantas y tiene implicaciones desfavorables para la economía y el medio ambiente (Lozoya-Saldaña, 2001).

Teniendo en cuenta estos problemas y el significado que tiene este frutal tropical en la producción y exportación de alimentos, se han dedicado numerosos esfuerzos y recursos a aplicar técnicas biotecnológicas en este grupo de plantas (Litz y Jaiswal, 1991; Akhtar *et al.*, 2000). Especial énfasis se le ha brindado al desarrollo de procesos morfogenéticos de regeneración de plantas completas mediante el cultivo *in vitro* de órganos y tejidos.

2.3 Procesos morfogenéticos *in vitro*. Aspectos generales y estudios realizados en el guayabo (*P. guajava* L.).

2.3.1 Clasificación e importancia de los procesos morfogenéticos desarrollados *in vitro*.

Los procesos morfogenéticos que se desarrollan en condiciones artificiales de cultivo *in vitro* se clasifican en dos vías fundamentales: la organogénesis y la embriogénesis somática.

La organogénesis se refiere a la formación de una estructura unipolar que finalmente se diferencia en un nuevo órgano, que en un caso puede ser meristemo caulinar (caulogénesis) y en otro un meristemo radicular (rizogénesis) (Pascual y Marín, 2005). Este proceso puede ocurrir a partir de estructuras preexistentes (yemas vegetativas) (Andreu y Marín, 2005), o de manera adventicia a partir de la formación de centros meristemáticos, los cuales son capaces de organizarse y conformar un ápice caulinar o radicular según el caso (Liu y Bao, 2003).

La embriogénesis somática es la vía del desarrollo celular mediante la cual las células somáticas dan lugar a estructuras semejantes a embriones cigóticos (organización bipolar sin conexión vascular al tejido parental) a través de una serie ordenada de estados embriológicos característicos sin que ocurra la fusión de gametos (von Arnold *et al.*, 2002; Jiménez, 2005). Este proceso ocurre de forma natural, especialmente en semillas con poliembrionía de origen somático, que es común en algunas especies de plantas como *Eugenia jambo* y *Eugenia malaccensis* (*Myrtaceae*) (Litz, 1984a), y de forma no natural a partir del cultivo de células o tejidos somáticos en condiciones artificiales *in vitro* (Stefanello *et al.*, 2005).

Ambos procesos pueden ocurrir de manera directa a partir del tejido del explante inicial, o indirectamente a partir de un tejido de menor organización, formado previamente y denominado

callo (George, 1993; Merkle *et al.*, 1995). A partir del manejo de estos procesos morfogénéticos en condiciones de cultivo *in vitro* se han desarrollado varias aplicaciones biotecnológicas. Entre las más frecuentes están la transformación genética (Tian *et al.*, 2002), la conservación *in vitro* y a ultra-bajas temperaturas (Keller *et al.*, 2006) y la producción de compuestos naturales (Walker *et al.*, 2002). Sin embargo, el uso de la morfogénesis para la propagación *in vitro* o micropropagación, resulta la de mayor impacto económico (George, 1993).

En la actualidad esta aplicación constituye una industria altamente rentable en numerosos países. Su uso ha alcanzado numerosas especies y tipos de plantas. Especial atención han merecido las especies frutales tropicales y subtropicales donde ésta técnica ha surgido como alternativa, a pesar de la existencia de métodos convencionales eficientes de propagación vegetativa (Litz y Jaiswal, 1991).

2.3.2 Organogénesis in vitro. Su aplicación en la propagación de especies leñosas y en el guayabo.

2.3.2.1 Propagación in vitro en especies leñosas con énfasis en Myrtaceae.

En las especies leñosas se han llevado a cabo procesos de organogénesis *in vitro* tanto, a partir de yemas vegetativas pre-existentes (Antunes De Moraes *et al.*, 2004; Texeira *et al.*, 2004), como de yemas adventicias inducidas en órganos diversos. Los más frecuentes son hipocótilos, cotiledones y hojas (Wulff y Peters, 2002; Gentile *et al.*, 2002). Sin embargo, la primera vía morfogénética es la que ha tenido el mayor impacto desde el punto de vista de la propagación *in vitro*.

La propagación *in vitro*, también conocida como micropropagación, muestra ventajas importantes en comparación con los métodos convencionales para numerosas especies frutales tropicales y subtropicales (Litz y Jaiswal, 1991). Entre esas ventajas se destacan: un incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo; una reducción del tiempo de multiplicación; la posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente costables; la posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual solo existen pocos individuos; y todo con un mayor control sobre la sanidad del material vegetal que se propaga, lo cual facilita además el intercambio de germoplasma (Villalobos y Thorpe, 1991).

En la propagación *in vitro* de las *Myrtaceae*, también se observan esas ventajas (Toussaint *et al.*, 1992; List *et al.*, 1996; Sha Valli Khan *et al.*, 1999; Oltramari *et al.*, 2000). En éstos protocolos, la principal barrera se relacionó generalmente con la etapa del establecimiento *in vitro*. Por tanto, estos

estudios se basaron fundamentalmente en la búsqueda de explantes, y en la evaluación de condiciones de cultivo o formas de manipulación del explante para lograr la mayor eficiencia.

En sentido general este grupo de plantas se caracterizó por ser recalcitrante al cultivo *in vitro* con algunas excepciones, como *Melaleuca alterifolia* (List *et al.*, 1996). En otros casos la dificultad para lograr el establecimiento *in vitro* del material adulto fue mayor y condujo al uso de material vegetal procedente de semillas recién germinadas (Le Roux y Van Staden, 1991). Otros autores acudieron a formas de manipulación y métodos de doble desinfección más complejos (Patil y Kuruvinashetti, 1998). En el *Acca sellowiana* (Berg.) Burret, frutal nativo de la parte meridional brasileña, se acudió al aislamiento y germinación de embriones cigóticos maduros para obtener las yemas apicales y lograr así la propagación *in vitro* (Oltramari *et al.*, 2000).

En el resto de las fases del proceso de micropropagación de las *Myrtaceae* se observó una menor complejidad. En la multiplicación, para lograr los mejores resultados en la brotación de las yemas axilares y apicales, se utilizaron principalmente las citoquininas BAP y Kin, en concentraciones variadas de 0.45–4.5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, mientras que las combinaciones con auxinas fueron poco frecuentes (Toussaint *et al.*, 1992; List *et al.*, 1996; Oltramari *et al.*, 2000). En la fase de enraizamiento se apreciaron resultados diversos. En unos casos, como *Eugenia smithii* Poir (Toussaint *et al.*, 1992), fue suficiente colocar los microesquejes o segmentos de tallo en medio MS (25% sales) con 4.9-5.7 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AIB, AIA o ANA, para alcanzar más de un 90% de brotes enraizados. En otros, como el *Acca sellowiana* (Berg.) Burret, la concentración óptima de AIB fue de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Oltramari *et al.*, 2000). La fase de aclimatización de los brotes enraizados no se describió como un proceso recalcitrante en ninguno de los protocolos publicados para estas especies, por el contrario, se informaron niveles de supervivencia que oscilaron entre el 70–90%.

En Cuba existen experiencias en el cultivo *in vitro* del *Psidium salutare* Berg. (Guayabita del Pinar) un componente importante de la biodiversidad de la región occidental (Sotolongo, 2000). El establecimiento *in vitro* se logró a partir de segmentos nodales y brotes jóvenes de ramas leñosas de plantas adultas colocadas en agua. La mayor tasa de multiplicación se obtuvo con la combinación de BAP 4.5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ y AIA 0.57 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. El enraizamiento se logró cultivando los brotes individualizados en medio WPM (50% sales) complementado con carbón activado 1.0 g.L^{-1} , ANA 1.07 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ y AIB 0.98 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Las plantas regeneradas *in vitro* se aclimatizaron con un 90% de supervivencia.

2.3.2.2 Propagación *in vitro* en el P. guajava L.

En el cultivo del guayabo, resulta necesario establecer sistemas de producción de árboles a través de la propagación vegetativa de cultivares seleccionados, para así, asegurar la formación de plantaciones uniformes, altamente productivas y con frutos de propiedades ajustadas a los requerimientos del mercado y la industria (Laura y Arango, 2001). Por esa razón el uso de la organogénesis *in vitro* pudiera tener un impacto favorable en la propagación de este cultivo.

Los trabajos sobre propagación *in vitro* del guayabo no son abundantes. La mayoría señalaron, como principal vía morfogenética, la organogénesis a partir de yemas vegetativas preexistentes. No obstante, también se señalaron la formación de brotes adventicios a partir de hojas de plántulas cultivadas *in vitro* (Loh y Rao, 1989) y de hipocótilos de semillas germinadas *in vitro* (Singh *et al.*, 2002a).

En general los trabajos más relevantes, se realizaron en cultivares de la región Indo-asiática (Jaiswal y Amin, 1987; Amin y Jaiswal, 1987, 1988; Loh y Rao, 1989; Papadatou *et al.*, 1990; Mohamed-Yasseen *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 2001). La aplicación de esos procedimientos en cultivares de la región del Caribe resultaron menos eficientes (Ramírez y Salazar, 1997; Ramírez *et al.*, 1999a). A continuación se describen las principales características de cada una de las fases del proceso.

- Establecimiento *in vitro*: Esta fase constituye un paso crítico dentro del proceso tecnológico de micropropagación de cualquier especie (George, 1993). Para el guayabo, es la etapa de mayor importancia, pues la selección del material vegetal, fundamentado en tres problemas cruciales: la contaminación, la fenolización y la capacidad de brotación, constituyó el tema más abordado en los protocolos de propagación *in vitro* publicados (Loh y Rao, 1989; Khattak *et al.*, 1990; Siddiqui y Farooq, 1996; Ramírez y Salazar, 1997). Especialmente cuando se utilizó material colectado a partir de plantas adultas (Jaiswal y Amin, 1987; Amin y Jaiswal, 1987, 1988; Singh *et al.*, 2001).

La importancia que reviste el control de las contaminaciones para el cultivo *in vitro* del guayabo promovió el desarrollo de varios estudios donde se compararon diversos métodos y agentes de desinfección (Khattak *et al.*, 1990; Ramírez *et al.*, 1999a). Estos métodos incluyeron el uso de detergentes antisépticos para el lavado de los explantes, así como aditivos antibióticos y antifúngicos. Además, utilizaron complejos procedimientos de doble desinfección con bicloruro de mercurio en concentraciones de 0.05-0.2% (m/v) durante 2-15 min, combinado con inmersiones en etanol 70% (v/v) por algunos segundos (Jaiswal y Amin, 1987; Amin y Jaiswal, 1987, 1988; Siddiqui y Farooq, 1996). Otros lograron la asepsia necesaria lavando los explantes con etanol al 80% (v/v)

durante 5 min, seguido de una desinfección con hipoclorito de sodio al 10% (v/v) durante 10 min y varios enjuagues con agua destilada estéril con PVPP 0.5% (m/v) (Papadatou *et al.*, 1990).

En relación con la fenolización, todos los trabajos coinciden en mencionar este fenómeno como uno de los más críticos para esta especie. El mismo se caracterizó por la aparición de pigmentos oscuros en la superficie del explante y una exudación de éstos hacia el medio de cultivo, que al aumentar en intensidad provocó la muerte de los explantes (Siddiqui y Farooq, 1996). Este hecho constituye un serio problema para la supervivencia de meristemos y ápices sobre todo de especies leñosas (George, 1993). Sin embargo, para Lorenzo *et al.* (2001), los fenoles no fueron necesariamente dañinos para los cultivos de caña de azúcar en sistemas de inmersión temporal y realmente promovieron la proliferación *in vitro*. No obstante, en el guayabo cuando se produjo este fenómeno, disminuyó significativamente el crecimiento y desarrollo del explante (Amin y Jaiswal, 1988; Khattak *et al.*, 1990; Ramírez y Salazar, 1997; Ramírez *et al.*, 1999b).

Para evitar este fenómeno, Siddiqui y Farooq (1996), enjuagaron después de la desinfección los segmentos nodales de plantas de 4-6 meses de edad, con varios antioxidantes como el ácido cítrico, el ácido ascórbico y el PVPP, a diferentes concentraciones por 20-30 min. En todos los tratamientos disminuyó la fenolización, pero los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó el PVPP 250 mg.L⁻¹. En el guayabo este antioxidante resultó favorable en concentraciones de 0.25-0.5% (m/v), tanto para el enjuague de los explantes (Jaiswal y Amin, 1987) como en forma de aditivo al medio de cultivo (Loh y Rao, 1989). En otros estudios se demostró que la exudación fenólica puede ser disminuida al reducir la exposición de las plantas madres a la irradiación solar, lo cual promueve un incremento en la supervivencia de los meristemos apicales y las yemas axilares y una disminución marcada en el contenido de fenoles simples (León *et al.*, 1997). No obstante lo anterior, en la mayoría de los casos, la fenolización persiste aún después de varios subcultivos.

Los mejores resultados en el establecimiento *in vitro* se señalaron en los trabajos donde se utilizó como material de partida tejidos juveniles de plántulas con pocas semanas de edad o de semillas recién germinadas. Este aspecto se comprobó aplicando técnicas de detección de fenoles simples (Papadatou *et al.*, 1990; Mohamed -Yasseen *et al.*, 1995). Para Pérez *et al.* (2002), la contaminación no resultó un serio problema, al igual que la excreción de compuestos fenólicos, debido a que utilizaron como material vegetal, brotes de semillas germinadas *in vitro*.

En la forma rústica del guayabo ‘Cotorrera’, se utilizaron explantes nodales de brotes de semillas recién germinadas y de plántulas jóvenes etioladas en la oscuridad, que se desinfectaron en hipoclorito

de sodio 1.25% (v/v), durante ocho minutos, seguido de varios enjuagues con una mezcla de ácido ascórbico y ácido cítrico (Rodríguez *et al.*, 2006). Los mejores resultados (75-100% establecidos) se alcanzaron cuando al medio basal MS se le añadió BAP $4.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ solo o en combinación con AIA $1.71\text{-}2.85 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Además señalaron una baja incidencia de la contaminación y la fenolización de los explantes, en especial con el material colectado en época de invierno.

Con relación a las condiciones de cultivo utilizadas para la brotación de las yemas, éstas fueron muy similares en casi todos los trabajos. En ellos se hizo un uso frecuente del medio MS enriquecido con BAP en concentraciones de $0.44\text{-}8.88 \mu\text{mol.L}^{-1}$ como principal regulador del crecimiento, con excepción de Papadatou *et al.* (1990) y Singh *et al.* (2001), quienes utilizaron como formulación basal el medio OM y el medio WPM, respectivamente. La adición de reguladores del crecimiento de tipo auxínico, al medio de establecimiento, fue menos frecuente. Sin embargo, para Jaiswal y Amin (1987) la inclusión de AIA $0.57\text{-}2.85 \mu\text{mol.L}^{-1}$ aseguró una mayor calidad de los brotes. El uso de medios de cultivo gelificados con agar fue frecuente, excepto para Rodríguez *et al.* (2006), quienes utilizaron medio líquido con resultados muy favorables. El resto de las condiciones fueron reiteradas en todos los trabajos, la inoculación de las yemas en tubos de cultivo, la incubación en cámara de luz con fotoperíodo de 16 horas luz, intensidad de $35\text{-}40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$.

De manera general, esta fase se considera la más recalcitrante del proceso cuando se trabaja material de plantas adultas, donde los problemas de contaminación y exudación de compuestos fenólicos, perjudican la brotación y el desarrollo del cultivo *in vitro*. Por esta razón muchos autores desarrollaron protocolos alternativos utilizando material vegetal procedente de plántulas juveniles o de semillas recién germinadas, en condiciones controladas.

- *Multiplicación o proliferación de los brotes:* Esta fase se trata de manera similar en la mayoría de los protocolos publicados (Pontikis, 1996). En ellos se demostró que la multiplicación *in vitro* del guayabo se realiza fundamentalmente por segmentos nodales y brotación axilar.

Amin y Jaiswal (1987) plantearon la multiplicación de segmentos nodales en el cultivar 'Chittidar', mediante el uso del medio basal MS enriquecido con BAP $4.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, y alcanzaron una razón de multiplicación de 3-4 brotes por explante. Para el cultivar 'Banaras Local', iguales condiciones, permitieron un promedio de 4.6 brotes por explante (Amin y Jaiswal, 1988). Para, Loh y Rao (1989) los niveles óptimos de BAP fueron de $0.044 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para hipocótilos y $0.44 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para ápices y segmentos nodales. El promedio de brotes regenerados, después de 8 semanas de cultivo, fue de 5.68 para hipocótilos, 3.2 para segmentos nodales y 1.29 para ápices.

Otros autores utilizan concentraciones más elevadas de citoquinina y tiempos de cultivos más prolongados para incrementar los coeficientes de multiplicación. Por ejemplo, Papadatou *et al.* (1990), en ápices de plantas procedentes de semillas, señalaron resultados satisfactorios cuando emplearon el medio basal OM suplementado con BAP $8.9 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Después de 16 semanas de cultivo, obtuvieron un promedio de 10 brotes por explante. De igual forma, en los experimentos realizados por Mohamed-Yasseen *et al.* (1995), donde, los mejores resultados se obtuvieron cuando usaron BAP $8.9 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Las semillas germinadas con BAP poseían un mayor número de brotes laterales que las germinadas en ausencia de éste (3.4 y 1.2, respectivamente). La multiplicación de los brotes obtenidos de las semillas se realizó con BAP $4.26 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

En la multiplicación de los brotes del guayabo ‘Cotorrera’, se alcanzaron los mejores resultados (5.5 brotes por explante) en medio de cultivo líquido con BAP $4.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ y AIA $2.85 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Rodríguez *et al.*, 2006). En el cultivar Enana Roja Cubana, durante la multiplicación de brotes provenientes de semillas germinadas *in vitro*, el BAP se identificó como el regulador del crecimiento más apropiado, superior al TDZ, al 2iP y a la Kin (Pérez *et al.*, 2002).

- Enraizamiento in vitro de los brotes o microesquejes: Sobre esta fase, la mayoría de los trabajos son concluyentes en cuanto al uso de reguladores del crecimiento con carácter auxínico.

Jaiswal y Amin (1987) señalaron una eficiencia entre 70-90% para el enraizamiento cuando utilizaron las sales MS (50% sales) suplementadas con sacarosa 30g.L^{-1} , AIB $0.98 \mu\text{mol.L}^{-1}$ y ANA $1.07 \mu\text{mol.L}^{-1}$. En los cultivares 'Banaras local' y 'Chittidar' para lograr un 80% de eficiencia, se emplearon las sales MS (50% sales) suplementadas con sacarosa 15g.L^{-1} , AIA $1.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ y ANA $1.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Amin y Jaiswal, (1987, 1988). En otro caso, Papadatou *et al.* (1990), alcanzaron los mejores resultados con ANA $2.69 \mu\text{mol.L}^{-1}$ y AIB $2.46 \mu\text{mol.L}^{-1}$, como suplementos del medio basal OM, con un enraizamiento del 95 y 85%, respectivamente. Estos resultados fueron significativamente superiores al tratamiento control sin regulador del crecimiento auxínico.

Por el contrario, Loh y Rao (1989) lograron enraizar con éxito, el 100% de los brotes procedentes de la multiplicación *in vitro* de segmentos nodales de plántulas recién germinadas y de injertos de 6-8 meses de edad, después de 2-3 semanas de cultivo en medio basal MS sin reguladores del crecimiento. Estos autores asociaron esos resultados al uso de tejidos parcialmente rejuvenecidos. De igual forma ocurrió para el guayabo cv. Enana Roja Cubana durante la propagación *in vitro* a partir de semillas recién germinadas (Pérez, 2000). No obstante, hay casos como el de la guayaba ‘Cotorrera’ que a pesar de utilizar material vegetal proveniente de semillas recién germinadas y de

plántulas jóvenes, el enraizamiento de los brotes fue significativamente inferior en medio MS sin reguladores del crecimiento (Rodríguez *et al.*, 2006). Cuando se añadió carbón activado 1.0 g.L⁻¹ y AIA o AIB (1.14 y 0.98 µmol.L⁻¹, respectivamente) se alcanzó más de un 80% de enraizamiento.

- *Aclimatización o adaptación a las condiciones naturales*: Sobre esta etapa la información no es muy abundante y en algunos casos solo se mencionan resultados a pequeña escala.

De manera general, en el guayabo, la aclimatización de los brotes o microesquejes enraizados no se caracterizó por ser recalcitrante. Sin embargo, no por ello dejó de constituir un paso crítico dentro del procedimiento de propagación *in vitro*, como ocurre para muchas otras especies (George, 1993). Los resultados más bajos fueron referidos por Amin y Jaiswal (1988), quienes lograron un 70% de supervivencia en la transferencia al suelo, cuando se colocaron los brotes enraizados en pots plásticos pequeños con una mezcla de suelo y compost (1:1) y se cubrieron con recipientes de cristal para elevar la humedad relativa durante los primeros 7-10 d. Por el contrario, Loh y Rao (1989), cuando transfirieron los brotes enraizados a condiciones de alta humedad relativa similares, obtuvieron una supervivencia del 80%. En los estudios restantes se señalaron porcentajes de supervivencia en la aclimatización del 80-90% (Papadatou *et al.*, 1990; Mohamed -Yasseen *et al.*, 1995).

Pérez (2000), en el cultivar Enana Roja Cubana, logró un 97.6% de supervivencia de las plántulas mediante una siembra en zeolita 100% (v/v), un sombreado del 70% y un sistema de riego automatizado por microaspersión de 10 seg cada 5 min durante los primeros 30 d. Luego las plántulas se transplantaron individualmente a bolsas de nylon polietileno que contenían una mezcla de cachaza y suelo ferralítico rojo en proporción 1:2 (v/v) con un régimen de riego menos frecuente para dar inicio a una etapa de vivero que duró aproximadamente 4 meses. En el guayabo ‘Cotorrera’, Rodríguez *et al.* (2006), lograron más de un 80% de supervivencia en esta fase.

Otros trabajos señalaron el uso de hongos micorrizógenos para mejorar el crecimiento de las vitroplantas de guayabo en la aclimatización (Estrada-Luna *et al.*, 2000). Estos autores plantearon que después de seis semanas de cultivo en aclimatización las plántulas micorrizadas mostraron un mayor crecimiento de los brotes y una mayor frecuencia de emisión de hojas que las plántulas no tratadas, lo cual se correspondió con un incremento en la fotosíntesis y en la conductancia estomática de las primeras. No obstante, también señalan que ambos grupos de plántulas sobrevivieron satisfactoriamente al shock del trasplante. Este comportamiento de las vitroplantas de guayabo durante la aclimatización pudiera estar asociado a características del sistema radicular emitido en

condiciones *in vitro*. Sin embargo, este aspecto no se ha abordado en ninguno de los trabajos publicados y revisados durante este estudio.

2.3.3 Embriogénesis somática *in vitro*. Su aplicación en la regeneración de plantas en especies leñosas y en el guayabo.

La embriogénesis somática *in vitro* se informó por vez primera hace casi 50 años atrás, sin embargo, es aún objeto de numerosos estudios por su importancia (von Arnold *et al.*, 2002). Su connotación se debe a sus usos como sistema modelo para estudiar el desarrollo de los eventos moleculares, citológicos y fisiológicos que sustentan la embriogénesis en las plantas (von Aderkas *et al.*, 2001; 2002), por ser un sistema adecuado para la propagación masiva en algunas especies (Guerra *et al.*, 1997) y por servir de herramienta para asistir el mejoramiento genético (Cerdeira *et al.*, 2002) y la conservación de germoplasma (Changrun *et al.*, 1999).

2.3.3.1 Embriogénesis somática *in vitro* en especies leñosas con énfasis en Myrtaceae.

Existen numerosos factores que inciden en el proceso de embriogénesis somática *in vitro* en las leñosas y al respecto la información es abundante (Merkle *et al.*, 1995; Dustan *et al.*, 1995; von Arnold *et al.*, 2002; Jiménez, 2005).

La especie o genotipo es uno de los factores más importantes. De hecho, existen especies modelos como la zanahoria (Ibaraki *et al.*, 2000), en las cuales casi cualquier parte de la planta puede ser utilizada para establecer un cultivo embriogénico y otras especies más recalcitrantes, como algunas leguminosas forestales de Argentina (Marinucci *et al.*, 2004), en las cuales solo explantes muy específicos son capaces de responder. Dentro de las especies de menor respuesta, es común observar genotipos que responden con mayor facilidad que otros a un esquema particular de condiciones de inducción (Jiménez, 2005).

Otros factores de mucha importancia son el tipo de explante y su estado fisiológico. Al respecto, numerosos tejidos y órganos se utilizan para la inducción de la embriogénesis somática *in vitro*. No obstante, en las leñosas, al igual que en algunas gramíneas, el éxito se ha visto limitado a unos pocos órganos o partes de éstos especialmente tejidos juveniles (Rodríguez *et al.*, 2005b). A pesar de que se plantea que todas las células del vegetal poseen la información genética necesaria para dar lugar a una nueva planta completa (totipotencia), en realidad, solo unos pocos tejidos son capaces de realizarlo (Merkle *et al.*, 1995). Se considera que la iniciación del estado embriogénico está restringido a determinados tipos de células “reactivas” que existen en el explante primario las cuales

tienen el potencial para activar los genes que están involucrados en la generación de células embriogénicas (von Arnold *et al.*, 2002).

Entre los explantes más comunes para inducir la embriogénesis somática *in vitro* en las leñosas se encuentran los embriones cigóticos (Kim *et al.*, 1999; Mauri y Manzanera, 2003), los tejidos nucelares (Cardoza y D'Souza, 2002; Rivera-Domínguez *et al.*, 2004), integumentos de semillas inmaduras (Blanc *et al.*, 1999), hipocótilos y cotiledones de plántulas en germinación (Zhang *et al.*, 2000; Nugent *et al.*, 2001), y algunos órganos florales (Li *et al.*, 1998; Stefanello *et al.*, 2005). Pocas especies leñosas muestran un potencial embriogénico tan alto en explantes de hojas, como el *Quercus sp. L.* (Hernández *et al.*, 2003; Toribio *et al.*, 2004).

En las *Myrtaceae* los embriones cigóticos son los explantes de mejores resultados y el estado fisiológico de éstos resulta un factor determinante y contradictorio en ocasiones. En el *Myrtus communis L.*, por ejemplo, mientras algunos autores plantean que los embriones cigóticos inmaduros producen los mejores resultados (Parra y Amo-Marco, 1999), otros aseguran que ésta ocurre solo cuando se utilizan embriones cigóticos cotiledonares maduros (Canhoto *et al.*, 1999). En algunas *Myrtaceae* con poliembrionía natural se utilizan embriones inmaduros de origen nucelar, los cuales necesariamente deben ser escindidos de frutillos inmaduros con un tamaño particular (Litz, 1984a, 1984b). En muy pocas ocasiones se logra éxito con otros tipos de explantes. En *F. sellowiana* Berg. por ejemplo, los ovarios, pétalos y estambres de yemas florales antes de la antesis, en presencia de Picloram ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) y Kinetina ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$), mostraron un porcentaje de inducción de callo con estructuras embriogénicas superior al 80% (Stefanello *et al.*, 2005).

El medio de cultivo constituye otro de los factores que influye en el proceso de embriogénesis somática *in vitro*. En el análisis de este factor se tienen en cuenta su función nutricional, su actividad biorreguladora, los productos con actividad hormonal, el pH y el estado físico (von Arnold *et al.*, 2002). En más del 80% de los casos se ha señalado el uso de las sales del medio basal MS o modificaciones de éste para la inducción de la embriogénesis somática *in vitro* (Dustan *et al.*, 1995; Jiménez, 2005). No obstante, varios estudios se han dedicado a comparar diferentes formulaciones salinas en la inducción de cultivos embriogénicos (Canhoto y Cruz, 1994; Fisichella *et al.*, 2000; Shahana y Gupta, 2002; Mauri y Manzanera, 2003).

En las *Myrtaceae*, el medio basal MS es la formulación más utilizada (Litz, 1984a; 1984b; Canhoto y Cruz, 1996; Parra y Amo-Marco, 1999). Sin embargo, otros casos exitosos como el de la *Feijoa*

sellowiana, han logrado los mejores resultados con modificaciones del medio basal LPm (Guerra *et al.*, 1997; Dal Vesco y Guerra, 2001).

El uso de reguladores del crecimiento de tipo auxínico, en la inducción y proliferación de cultivos embriogénicos está muy bien documentado (Dustan *et al.*, 1995; Jiménez, 2005). Muchos autores consideran este grupo de sustancias como las más importantes en la inducción y regulación de la embriogénesis somática *in vitro* (von Arnold *et al.*, 2002; Fehér *et al.*, 2003; Gaj, 2004; Jiménez, 2005). En las *Myrtaceae*, los principales agentes inductores empleados para promover el desarrollo de cultivos embriogénicos son precisamente los reguladores del crecimiento de carácter auxínico (Litz, 1984a; 1984b; Litz *et al.*, 1998; Canhoto *et al.*, 1999; Nugent *et al.*, 2001; Stefanello *et al.*, 2005).

El 2,4-D es el regulador del crecimiento sintético más eficiente para inducir la embriogénesis somática y por tanto el más utilizado en la mayoría de los sistemas de cultivos embriogénicos (Fehér *et al.*, 2003; Jiménez, 2005). Otros reguladores del crecimiento con carácter auxínico, como el Picloram (Groll *et al.*, 2001; Cardoza y D'Souza, 2002) y el Dicamba (Plazek *et al.*, 1999), se han utilizado con éxito, aunque en menor frecuencia que el 2,4-D (Gaj, 2004).

El uso de altas concentraciones de auxinas durante largos períodos de inducción, a menudo, produce embriones somáticos morfológicamente anormales con una pobre germinación (Jiménez, 2005). Por esa razón, las condiciones del medio de cultivo deben ser modificadas durante el desarrollo del proceso embriogénico, y ensayadas en cada caso en particular.

El proceso a través del cual el embrión somático transita desde la etapa globular hasta la etapa cotiledonar, se denomina histodiferenciación y las condiciones de cultivo, bajo las cuales se lleva a cabo, tienen un efecto determinante en la regeneración de la planta completa (Merkle *et al.*, 1995). En las *Myrtaceae*, la histodiferenciación de los embriones somáticos ocurre en el mismo medio de inducción, lo cual da lugar a cultivos completamente asincrónicos (Canhoto *et al.*, 1999; Guerra *et al.*, 2001). No obstante, en *Feijoa sellowiana* cuando se redujo el Picloram y la Kin a $1.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ y $0.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ respectivamente, se produjo un efecto favorable en la formación de embriones somáticos y en el incremento de la masa fresca de los cultivos (Stefanello *et al.*, 2005). El uso de protocolos con un solo medio de cultivo donde se produce la histodiferenciación y la subsiguiente fase de maduración simultáneamente es frecuente (Canhoto *et al.*, 1999; Guerra *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002) y por esa razón se hace difícil distinguir si un tratamiento afectó uno u otro proceso (Merkle *et al.*, 1995).

La maduración es una fase clave entre el desarrollo del embrión y la germinación, ya que en ésta tiene lugar la acumulación de sustancias de reserva, necesarias para la germinación del mismo (von Aderkas *et al.*, 2001). El ABA es un importante regulador de la acumulación de esas sustancias y la aplicación exógena de éste tiene un efecto favorable en la maduración del embrión somático *in vitro* (von Aderkas *et al.*, 2002). En las *Myrtaceae* existe poca información sobre la maduración de los embriones somáticos. El único trabajo encontrado, señala que en la *F. sellowiana*, el ABA favoreció la maduración de los embriones somáticos por la acumulación de proteínas de reservas, y además, incrementó significativamente la germinación en comparación con los embriones que no fueron cultivados en presencia de este regulador del crecimiento (Alvelos *et al.*, 2000).

Adicionalmente al ABA, otras sustancias se utilizan para facilitar la maduración de los embriones somáticos. Los carbohidratos por ejemplo, con un efecto sensible en la calidad y cantidad de embriones, tienen como principal función ser fuente de carbono, sin embargo, parte importante de su efecto es como regulador osmótico en el medio (Witjaksono y Litz, 1999a,b; Garin *et al.*, 2000). En soya, se utilizó el PEG, en el estrés osmótico necesario para inducir la mayor cantidad de embriones somáticos maduros e incrementar la germinación y conversión en planta (Walker y Parrot, 2001).

Con frecuencia las modificaciones para promover el desarrollo de la embriogénesis somática *in vitro* están asociadas a cambios en el estado físico del medio de cultivo. El uso del medio líquido para la histodiferenciación-maduración de embriones somáticos es menos frecuente que para la proliferación de las masas celulares pro-embriogénica de los embriones (Merkle *et al.*, 1995; Palada-Nicolau, 2002). No obstante, existen algunos casos (Lee *et al.*, 2002). En *F. sellowiana* se utilizó el cultivo de suspensiones celulares para la proliferación de las masas celulares embriogénicas (Stefanello *et al.*, 2005).

Son numerosas las ventajas que este tipo de medio proporciona, en especial en el proceso de embriogénesis somática. Para el *Quercus ilex* L., por ejemplo, el cultivo de los tejidos con estructuras embriogénicas en medio líquido propició una alta frecuencia de proliferación, un rápido crecimiento del embrión somático, facilidad en la absorción de nutrientes, y los embriones somáticos se hicieron más sobresalientes en el callo o agregado celular. Adicionalmente, se redujo la labor del subcultivo y se facilitó la automatización en bioreactores (Mauri y Manzanera, 2003).

Existen también otros factores que influyen en la inducción y desarrollo de la embriogénesis somática *in vitro*. El ambiente gaseoso del frasco de cultivo, especialmente el intercambio de gases con el ambiente y el contenido de CO₂, O₂ y Etileno en el espacio gaseoso, son aspectos que tienen

una incidencia marcada en el proceso completo (Merkle *et al.*, 1995). La intensidad de la luz, su calidad y el fotoperíodo a que son sometidos los explantes inciden especialmente en la fase de inducción (D'Onofrio *et al.*, 1998). La temperatura también tiene un efecto importante durante la maduración (Stasolla *et al.*, 2002).

2.3.3.2 Embriogénesis somática en el *P. guajava* L.

Para el cultivo del guayabo, el desarrollo de protocolos de regeneración de plantas completas a través de la embriogénesis somática puede impactar favorablemente en la propagación como vía alternativa y en especial, en el mejoramiento genético y la conservación de germoplasma, donde la aplicación de esta técnica como herramienta sería más importante. Sin embargo, el número de publicaciones al respecto es escaso.

De acuerdo con Pontikis (1996), el primer trabajo relacionado con la embriogénesis somática en *P. guajava* L. fue realizado en 1986 por Babbar y Gupta. En éste, se pretendió la formación de callos a partir del cultivo de anteras para la obtención de plantas haploides. A pesar de que se observó la formación de pro-embrioides microscópicos, la fenolización del callo imposibilitó su mantenimiento y la obtención de plantas. El resto de los trabajos publicados son más recientes.

Akhtar *et al.* (2000), hicieron una revisión del tema de la embriogénesis somática *in vitro* en especies frutales tropicales. Ellos informaron parte de los resultados obtenidos en una tesis doctoral presentada en 1997 en la Universidad Hindú de Banaras (Varanasi, India), sobre la embriogénesis somática en el guayabo. Estos autores plantearon que cultivar embriones cigóticos de 10 semanas de edad después de la antesis, en medio MS enriquecido con 2,4-D $4.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ y sacarosa 10% (m/v), incrementó en 5-8 veces la eficiencia embriogénica en esta especie. También, aseguraron que los embriones cigóticos son los explantes de mejores resultados porque ofrecen la mejor respuesta en la inducción y al mismo tiempo están libres de la exudación de compuestos fenólicos que caracterizó a otros tejidos. Además, plantearon que el desarrollo y la maduración de los embriones somáticos ocurren de forma continua a partir de la inducción, y que la proliferación se llevó a cabo como parte de un sistema de embriogénesis secundaria o recurrente, en la cual los embriones somáticos primarios se colocan como nuevas unidades de explantes para iniciar un nuevo ciclo de inducción. Por último, señalaron que la germinación fue más favorable en medio basal semisólido MS (50% sales) + sacarosa 30.0 g.L^{-1} , que en medio líquido, y refieren que la supervivencia de las plántulas regeneradas en la aclimatización fue cercana al 100% seguida de la transferencia a suelo.

Por su parte Ramírez y Salazar (1998), evaluaron el efecto de reguladores del crecimiento de carácter citoquinínico (zeatina, ribozeatina, 2-isopenteniladenina y benciladenina) sobre embriones cigóticos inmaduros para promover la formación del callo con estructuras embriogénicas y embriones somáticos en guayabo. Como mejor resultado lograron un 60% de inducción de embriones somáticos con Zeatina $0.46 \mu\text{mol.L}^{-1}$. No obstante, la maduración germinación y conversión en plantas de estos embriones somáticos no se logró.

En un estudio más reciente, se logró inducir la formación de callo con estructuras embriogénicas y la diferenciación de embriones somáticos a partir de tejidos inmaduros del mesocarpio del fruto en el cultivar 'Sardar' (Chandra *et al.*, 2004). Sin embargo, en este trabajo no se brindó suficiente información sobre el estado de desarrollo del fruto y menos aún sobre el subsiguiente desarrollo del proceso embriogénico. Estos autores se limitaron a evaluar cuatro variantes de medio de cultivo para la inducción. Los mejores resultados se alcanzaron con los macroelementos del medio basal B5 y microelementos MS, enriquecidos con 2,4-D $9.04 \mu\text{mol.L}^{-1}$, ácido ascórbico 100mg.L^{-1} , glutamina 400mg.L^{-1} y sacarosa 6% (m/v). La frecuencia de explantes que mostraron inducción de tejido con estructuras embriogénicas varió entre un 85 y un 92% en dependencia de la estación en que se colectó el fruto.

En Cuba existen otros trabajos publicados que resultan de mucha importancia, pues se realizaron en el cultivar objeto de estudio de esta tesis. En el primero, se informó la inducción del proceso embriogénico en medio basal semisólido MS (50% macroelementos) suplementado con 2,4-D $4.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, glutamina 400mg.L^{-1} , ácido ascórbico 100mg.L^{-1} , y sacarosa 60.0g.L^{-1} , a partir de embriones cigóticos de frutos inmaduros de 25-35 d de edad después de la antesis y un tamaño particular de 3.5-3.8 cm de diámetro (Vilchez *et al.*, 2002). Con los embriones cigóticos en etapas torpedo y cotiledonar lograron inducir un proceso de embriogénesis somática de tipo indirecta y baja frecuencia de formación de callo con estructuras embriogénicas (12.0% y 7.7%, respectivamente).

En un segundo artículo, se señala el uso de un sistema de embriogénesis secundaria para la proliferación del cultivo embriogénico en el cultivar Enana Roja Cubana, y observaron una rápida proliferación masiva de embriones globulares secundarios cuando cultivaron explantes primarios (grupos de 35 embriones somáticos) en medio similar al anterior, suplementado con diferentes concentraciones de 2,4-D (Vilchez *et al.*, 2004). Igual comportamiento obtuvieron en el tratamiento sin regulador del crecimiento. No obstante, en la evaluación del número de embriones somáticos por explante primario, los mayores resultados (48.5) lo alcanzaron con el 2,4-D $4.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, después de

ocho semanas de cultivo. Adicionalmente, realizaron la germinación de los embriones somáticos secundarios regenerados y su conversión en planta. Los mejores resultados (83% de germinación y 47.5% de supervivencia en aclimatización) se alcanzaron con el uso de grupos de 20 embriones somáticos cultivados en medio basal semisólido MS (50% macroelementos) suplementado con BAP 0.25 mg.L^{-1} , Biobras-6 10 mg.L^{-1} y sacarosa 20.0 g.L^{-1} para la germinación y la plantación en bandejas de poliuretano de 247 cavidades con sustrato de zeolita 15% (v/v) y humus de lombriz 85% (v/v).

Gómez-Kosky *et al.* (2005), informaron recientemente, el uso de los sistemas de inmersión temporal modelo RITA[®] y el medio de cultivo señalado por Vilchez *et al.* (2004), para la germinación de los embriones somáticos del guayabo cv. Enana Roja Cubana, con resultados muy satisfactorios (91% de germinación), significativamente superior al medio semisólido (81.8%). Los embriones germinados en medio líquido no mostraron síntomas de hiperhidricidad. En este estudio no se abordó la conversión en planta en la fase de aclimatización *ex vitro*.

De manera general en los escasos estudios de embriogénesis somática *in vitro* en el guayabo, realizados hasta la fecha, se denota una baja eficiencia en relación al número de embriones somáticos cosechados y a los índices de conversión en planta. Adicionalmente, ofrecen poca información sobre los procedimientos para la proliferación de los tejidos con estructuras embriogénicas, así como de las condiciones para la histodiferenciación y maduración de los embriones somáticos. Contrario a otras especies *Myrtaceae* (Canhoto *et al.*, 1996; Guerra *et al.*, 1997; Canhoto *et al.*, 1999), en los estudios de embriogénesis somática del guayabo los análisis histológicos o histoquímicos están ausentes. De igual forma ocurre con otros aspectos de interés, que de conjunto, pueden ayudar a una mejor comprensión del proceso en esta especie, y por tanto, a lograr mayor eficiencia.

2.4 Estabilidad genética de las plantas regeneradas *in vitro*. Aspectos generales y estudios realizados en el guayabo (*P. guajava* L.).

El uso de las técnicas biotecnológicas para la producción de semillas tiene en contraposición que requiere la máxima estabilidad genética posible, viceversa al mejoramiento genético, donde se buscan cambios que transformen el material hereditario (Pérez-Ponce, 1998). El comportamiento celular normal es el resultado de una compleja cascada de programas genéticos que son sensibles a desarreglos por condiciones de estrés biótico y abiótico. El cultivo *in vitro per se* puede ser más o menos estresante para las células vegetales e involucrar procesos mutagénicos, o puede manifestar aquellas variaciones encubiertas en pequeñas porciones de tejido de la planta donadora o madre (Cardone *et al.*, 2004).

Todas estas variaciones pueden provocar que algunas de las plantas regeneradas sean físicamente diferentes a las plantas que le dieron origen (Mariano-Escandelai *et al.*, 2006).

2.4.1. Principales causas y factores que influyen en la variabilidad.

De acuerdo con George (1993), existen dos tipos de variaciones asociadas al cultivo de tejidos o células vegetales: aquella en la que ocurre un cambio genético permanente y en la que el cambio es solo temporal. Las primeras son conocidas como **variaciones somaclonales**, mientras que las segundas, se identifican como **cambios epigenéticos** (Cardone *et al.*, 2004). Larkin y Scowcroft (1981) propusieron el término de somaclon para describir las plantas originadas a partir de cualquier tipo de cultivo de tejido o células de origen somático. De esta forma la variación genética encontrada entre somaclones se denominó variación somaclonal (Cardone *et al.*, 2004).

De acuerdo con Pérez-Ponce (1998), las variaciones que se presentan cuando se obtiene una población de plantas *in vitro*, se deben a tres causas fundamentales: mutaciones, cambios epigenéticos, o rejuvenecimiento fisiológico, unido a un efecto del ambiente. Sin embargo, los mecanismos por los cuales ocurre la variación somaclonal no están completamente dilucidados (Cardone *et al.*, 2004).

Los eventos mutagénicos ocasionados por el cultivo de tejidos están directa o indirectamente relacionados con alteraciones en el estado del ADN, tanto nuclear como de los orgánulos (Devarumath, *et al.*, 2002; Loureiro *et al.*, 2005), y por lo general, tienen un carácter más estable y transmisible (Pérez-Ponce, 1998). Al contrario, los cambios epigenéticos no se segregan en las progenies ni cumplen con las leyes de la herencia, y aunque pueden transmitirse por varios ciclos de reproducción vegetativa, siempre desaparecen (Cardone *et al.*, 2004). En la actualidad, existen evidencias confirmadas de que la metilación del ADN y la metilación por la actividad de elementos transposables, puede decrecer con el período de tiempo que se mantiene el tejido en condiciones de cultivo *in vitro* (Joyce y Cassells, 2002). Este fenómeno también se asoció al rejuvenecimiento que promueve el cultivo *in vitro* de células y tejidos. Este rejuvenecimiento *in vitro* no está relacionado con el desarrollo ontogénico y se produce al perder el tejido la señal que poseía como parte de la planta (organismo completo). Esta pérdida es más rápida en la medida que el explante es más pequeño y se realizan más subcultivos *in vitro*. Esto provoca que el tejido del cual se regeneran sea más joven y por tanto los sistemas de expresión de genes cambien. En plantas obtenidas por vía vegetativa, esos sistemas funcionan, mientras que en las plantas madres o generadoras no lo hacen (Pérez-Ponce, 1998). De esta forma en muchos cultivos las plantas propagadas vegetativamente *in vitro* se parecen más a las

producidas por semillas (Joyce y Cassells, 2002). Las condiciones microambientales, bajo las cuales se encuentran los tejidos vegetales cultivados *in vitro*, también influyen en estos cambios, por lo que se hacen muy difíciles de separar las causas (Pérez-Ponce, 1998).

En la estabilidad genética de las plantas derivadas del cultivo *in vitro* pueden influir varios factores. El análisis detallado de cada uno sería extenso, sin embargo, vale la pena mencionar algunos. La principal causa de variabilidad que existe son las mutaciones preexistentes en el tejido que se utiliza como explante para iniciar el cultivo *in vitro*. De ahí la importancia que tienen factores como el genotipo, el tipo de explante a utilizar y su nivel de diferenciación (Pérez-Ponce, 1998). También influye significativamente la vía de regeneración a emplear y se refiere que la organogénesis adventicia incrementa de 4-10 veces la variabilidad con respecto a la organogénesis a partir de yemas axilares (Pérez-Ponce, 1998; Cardone *et al.*, 2004). La edad del cultivo *in vitro* incide y por lo general se asocia que las variaciones aumentan proporcionalmente con ella (Tremblay *et al.*, 1999). No obstante, existen algunas contradicciones. Por ejemplo, para Olmos *et al.* (2002) no existió relación lineal entre el número de subcultivos y la cantidad de variación obtenida durante la micropropagación de *Melia azedarach* L. Adicionalmente, también se asocian los reguladores del crecimiento con la ocurrencia de mutaciones y en ocasiones se utilizan para inducir las, especialmente si se manejan en concentraciones elevadas. No obstante, aún no está esclarecido si el efecto de estas sustancias es por una acción mutagénica directa o como resultado de la elevada tasa de división celular que éstos inducen (Cardone *et al.*, 2004).

2.4.4 Estudios de variabilidad genética realizados en el guayabo.

En la bibliografía consultada, no se encontraron trabajos de propagación *in vitro* del guayabo, que incluyeran estudios sobre la estabilidad genética del material producido. En la mayoría de los casos, solo se hace referencia al comportamiento de las plántulas durante la aclimatización (Amin y Jaiswal, 1987, 1988; Jaiswal y Amin, 1987; Loh y Rao, 1989) y no se realizan estudios agromorfológicos en condiciones de campo o a nivel bioquímico-molecular.

Los escasos trabajos que abordan el tema, lo hacen con un enfoque más orientado a la selección de líneas clonales a partir de material vegetal procedente de semillas germinadas *in vitro* (Collado *et al.*, 2002; Guerrero *et al.*, 2004; Nápoles *et al.*, 2004; García *et al.*, 2004; Sosa *et al.*, 2004). Estos estudios se caracterizaron por realizar análisis comparativos del comportamiento fenológico de los árboles y/o de las cualidades bromatológicas de los frutos, entre diferentes líneas clonales obtenidas a partir del cultivo *in vitro*. De forma general estos estudios coinciden en que la propagación *in vitro*

del guayabo a partir de semillas, es factible para establecer estudios de mejoramiento genético por selección, pero poco factible para la clonación.

Otros estudios dirigidos a la caracterización del banco nacional de germoplasma de guayabo, se realizaron utilizando marcadores agronómicos, morfológicos y moleculares (Rodríguez *et al.*, 2005c). Los marcadores utilizados permitieron asegurar que existe una base genética estrecha en el banco de germoplasma de Alquizar (La Habana), y además identificar algunos genotipos promisorios, entre los que se destacó el cultivar Enana Roja Cubana.

2.5 Consideraciones finales.

Luego de proporcionar una visión general del estado actual de la morfogénesis *in vitro* en el *P. guajava* L., y comparar ésta con otras leñosas *Myrtaceae*, se puede concluir que aún quedan numerosos aspectos por dilucidar. La mayoría de los trabajos revisados apuntan a un mayor desarrollo de las investigaciones en la región Indo-Asiática. Los trabajos de la región del Caribe son menos frecuentes y con comportamientos menos estables, sobre todo en las etapas inductivas del establecimiento *in vitro* (Ramírez y Salazar, 1997; Ramírez *et al.*, 1999b). Específicamente en el guayabo, los mejores resultados se obtienen con material proveniente de semilla, pues con tejido de material adulto la eficiencia es significativamente menor. Adicionalmente, se observa una carencia de estudios más básicos en relación con los procesos de organogénesis y embriogénesis somática *in vitro* en esta especie, los cuales pueden contribuir a alcanzar mejores resultados. La funcionalidad de las raíces desarrolladas *in vitro* por los brotes, el origen de las protuberancias y los brotes adventicios en las hojas cultivadas *in vitro*, el papel de la herida en ese proceso morfogenético, así como la diferenciación de embriones somáticos en condiciones de cultivo de mayor eficiencia de regeneración, son algunos de los elementos que pudieran ser estudiados. Finalmente, se aprecia que los principales estudios agro-morfológicos de campo de las plantas propagadas *in vitro*, se han enfocado más al mejoramiento genético y a la caracterización del germoplasma, que a estudiar la estabilidad genética del método de propagación *in vitro*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y METODOS

3.0 Procedimientos generales.

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos en coordinación con el Laboratorio de Ingeniería Metabólica del Centro de Bioplasmas. Se utilizó el cultivar de guayabo 'Enana Roja Cubana' o 'EEA 18-40', como también se le conoce. Los explantes iniciales para el cultivo *in vitro* se colectaron a partir de plantas elites adultas seleccionadas en plantaciones de la Empresa Cítricos Ceballos de la provincia de Ciego de Avila y en viveros de la mencionada entidad. Los experimentos se llevaron a cabo durante los meses de Enero/2001 a Mayo/2006, incluyendo los experimentos de campo.

El instrumental quirúrgico utilizado se esterilizó en estufa (MLW-WSU200) a 180°C durante 150 min. Las operaciones de inoculación y transferencias de los explantes en los medios de cultivo se realizaron en una cabina de flujo laminar horizontal ICEM-A7 (RETOMED®). La asepsia del instrumental se alcanzó con inmersiones en etanol 90% (v/v) y flameo con mechero de gas licuado. El pH de todos los medios de cultivo se ajustó a 5.7-5.8 antes de la esterilización en autoclave a una presión de 1.2 kg.cm⁻² y 121°C, durante 15-20 min. En el caso de los medios sólidos, el pH se ajustó, previo a la adición de agar No. 3 (BioCEN, Cuba) 6.6 g.L⁻¹. En los experimentos donde se hace mención a frascos de cultivo se refiere a pomos de vidrio de 250 mL de capacidad con tapa metálica de cierre *twig-soft*. En los otros casos, se hace referencia a tubos de ensayo (140 x 22 mm), placas de Petri (150 x 22 mm) y Erlenmeyers (50 y 100 mL, POBEL®). Los cultivos *in vitro* se desarrollaron, según el experimento, en condiciones de oscuridad a 25±2°C, denominada cámara oscura, o en condiciones de cámara de luz artificial a 26±2°C. En condiciones de luz artificial, se utilizó una intensidad lumínica de 12.5-37.5 μmol.m⁻².s⁻¹ y un fotoperíodo de 16 h luz, proporcionado por lámparas de luz fluorescente (20-40W, SYLVANIA®).

Para el procesamiento histológico se siguió un procedimiento similar para todas las muestras. Estas se fijaron por 24-48 h en solución F.A.A. (formalina-ácido acético-alcohol etílico) al 5-5-90% (v/v), respectivamente. A continuación se lavaron en agua corriente durante 24 h para eliminar el exceso de fijador. Una vez concluido el lavado, el tejido fue deshidratado en concentraciones seriadas de alcohol etílico (50, 75, 85 y 95%) sucesivamente cada 1.5-2.0 h. Seguidamente, las muestras se pasaron tres veces por alcohol etílico puro, durante dos horas cada pase. Después del proceso de deshidratación las muestras se aclararon con xilol y se embebieron en una serie de tres pases de

parafina (57-58°C) con un período de impregnación de 1.5 h por pase. Seguidamente se incluyeron en bloques de parafina a los que se les realizaron cortes seriados con un espesor de 5-8 µm, en un micrótopo manual de deslizamiento vertical. La técnica de tinción utilizada se especifica para cada caso en particular. Para la observación de los procesos morfogénicos se utilizaron: un estereomicroscopio Stemi SV6 (OPTON-ZEISS®), un microscopio plano Axioskop (OPTON-ZEISS®) o un microscopio invertido Axiovert 35 (OPTON-ZEISS®), según el caso. Todas las fotos se hicieron con una cámara digital Canon Power Shot G5 (CANON®), adaptada a los microscopios.

En el procesamiento de los datos de todos los experimentos se emplearon las pruebas estadísticas de Kolmogorov-Smirnov y el Test Levene para comprobar supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas, respectivamente. De cumplirse estos supuestos, se aplicó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de efectos fijos y de encontrarse diferencias significativas se aplicó la prueba de comparaciones múltiples DHS de Tukey. Para el caso en que se compararon dos muestras se utilizó solamente la prueba t-Student. De no cumplirse los supuestos anteriores, los datos expresados en porcentaje se transformaron según la ecuación: $X' = 2 \cdot \arcsen(\sqrt{((x/100) + 0.5)})$. Para las variables cuantitativas discretas se utilizó la ecuación: $X' = \sqrt{(x + 0.5)}$. Cuando la transformación de los datos no fue suficiente para lograr normalidad y homogeneidad de varianza, entonces se emplearon las pruebas no-paramétricas de Kruskal-Wallis para la comparación de tratamientos y de Student-Newman-Keuls para las comparaciones múltiples de rangos. Para las evaluaciones porcentuales se tomó como 100% el número inicial de explantes puestos en cultivo. En todos los casos se utilizó como procesador estadístico el *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, 2002) versión 11.5.1 sobre Windows (Copyright® SPSS Inc., 1998-2002).

3.1 Organogénesis *in vitro* a partir de yemas de árboles de campo del guayabo cv. Enana Roja Cubana.

3.1.1 Establecimiento *in vitro* de yemas de plantas de guayabo cultivadas en el campo.

3.1.1.1 Efecto del tiempo de desinfección con bicloruro de mercurio.

Con el objetivo de determinar el tiempo apropiado de desinfección con bicloruro de mercurio 0.05% (m/v) para las yemas de plantas de campo del guayabo cv. Enana Roja Cubana, se llevó a cabo el siguiente experimento. El mismo se inició con un procedimiento de preparación del material vegetal según Khattak *et al.* (1990). Para esto se seleccionaron brotes ubicados en los extremos de ramas de la copa de árboles de dos años de edad, que fueron elegidos de acuerdo a sus

características productivas y fitosanitarias. El extremo apical de las ramas se cubrió con una bolsa de nylon de polietileno negro para provocar la etiolación de los ápices. Dos semanas después, se colectaron los extremos apicales etiolados (segmento apical de longitud ≈ 3.5 cm, 1-2 pares de hojas abiertas y 2-3 nudos). A continuación se colocaron en una solución antioxidante estéril de PVPP 250 mg.L^{-1} para su traslado al laboratorio. Luego, los segmentos apicales se lavaron con detergente antiséptico clorado HALOGEN ESPECIAL[®] 3.0% (v/v) (IBERIA Inc., España) durante 15 min, en sustitución del Cetavlon[®] propuesto por Amin y Jaiswal (1988). Por último se enjuagaron tres veces con agua corriente.

A los extremos apicales lavados se les cortaron las hojas abiertas por el pecíolo sin dañar las yemas axilares y se les realizó una desinfección superficial con bicloruro de mercurio 0.05% (m/v) durante diferentes tiempos (**5, 10, 15 y 20 min**). Tres gotas de Tween 80 se añadieron al agente desinfectante. Luego de la desinfección se realizaron tres enjuagues con una solución antioxidante estéril de PVPP 250 mg.L^{-1} . Un tratamiento **testigo** sin desinfección fue establecido. Este último fue sometido solo a condiciones de lavado y enjuague similares a los tratamientos con desinfección. El tipo y concentración del agente desinfectante, y los rangos de tiempo, se definieron basados en los resultados obtenidos por Jaiswal y Amin (1987) y Amin y Jaiswal (1988).

Se aislaron segmentos de ápices y de nudos (longitud ≈ 0.5 cm), y se colocaron individualmente manteniendo la polaridad normal, en tubos de ensayo que contenían 10 mL de medio semisólido de pre-establecimiento, constituido por las sales del medio basal MS suplementadas con sacarosa 3.0% (m/v), mio-inositol 100 mg.L^{-1} , tiamina.HCl 1.0 mg.L^{-1} y PVPP 250 mg.L^{-1} . Se emplearon para cada tratamiento 30 segmentos apicales, con tres repeticiones del experimento. Todos los tratamientos se incubaron en las condiciones de luz artificial descritas en los Procedimientos Generales (Epígrafe 3.0) y se adoptó un diseño monofactorial en bloque completamente aleatorizado.

Durante los primeros 10 d de cultivo *in vitro*, se realizaron cuatro transferencias de los explantes al mismo medio fresco cada 48 h, para superar la oxidación fenólica y retirar la contaminación. Al finalizar este período, se realizó la observación visual y la evaluación del porcentaje de pérdidas por contaminación y por fenolización. Los explantes morfológicamente viables y no contaminados se evaluaron como porcentaje de supervivencia. Para el análisis estadístico se utilizaron como réplicas seis grupos aleatorios de cinco explantes cada uno.

3.1.1.2 Efecto de la concentración de BAP.

Con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes concentraciones de BAP en el establecimiento *in vitro* de las yemas de plantas de campo, se utilizó el material vegetal procedente del tratamiento de mejores resultados en el experimento anterior (Epígrafe 3.1.1.1). Los explantes morfológicamente viables y no contaminados, se clasificaron en **ápice** (yema apical encerrada en las hojas más jóvenes visibles) y **nudo** (segmento nodal inmediato inferior al ápice, con dos yemas axilares latentes). Estos se aislaron y se colocaron de manera individual en tubos de ensayo que contenían 10 mL de un medio semisólido de pre-establecimiento (Epígrafe 3.1.1.1).

Los explantes se transfirieron, individualmente y manteniendo la polaridad normal, a tubos de ensayo que contenían 10 mL de medio semisólido de establecimiento, constituido por las sales del medio basal MS suplementadas con sacarosa 3.0% (m/v), mio-inositol 100 mg.L⁻¹, tiamina.HCl 1.0 mg.L⁻¹, AIA 2.85 µmol.L⁻¹ y PVPP 250 mg.L⁻¹. Como tratamientos se añadieron diferentes concentraciones de **BAP (0.0, 2.2, 4.4 y 6.7 µmol.L⁻¹)**. Estos tipos y rangos de concentraciones de reguladores del crecimiento, fueron establecidos según los mejores resultados alcanzados en otros cultivares de guayabo (Jaiswal y Amin, 1987; Amin y Jaiswal, 1988). Se utilizaron un total de 30 explantes por tratamiento, con tres repeticiones del experimento. Todos los tratamientos se colocaron en las condiciones de luz artificial descritas en el epígrafe 3.0 y se adoptó un diseño bifactorial en bloque completamente aleatorizado.

A los 45 d de iniciado el cultivo en el medio de multiplicación, se evaluó el porcentaje de brotación y la longitud del brote crecido. Para el análisis estadístico del porcentaje de brotación, se utilizaron como réplicas, seis grupos aleatorios de cinco explantes cada uno. En el resto de las variables evaluadas se utilizó el explante individual.

3.1.1.3 Contenido de compuestos fenólicos de yemas de diferentes partes del árbol y su relación con el éxito en el establecimiento *in vitro*.

Este experimento se desarrolló con el objetivo de identificar en el cuerpo del árbol de campo un material vegetal (yemas vegetativas) que por sus características morfológicas y contenido intrínseco de compuestos fenólicos, permitiera una mayor eficiencia en el establecimiento *in vitro* (o sea menor oxidación fenólica y mayor brotación). Para esto se realizó la colecta de un lote de brotes (con tres pares de hojas abiertas), clasificados de acuerdo a la posición topofísica que presentaban en el árbol:

§ De la **copa** (brotes juveniles ubicados en el extremo de las ramas de la copa).

§ Del **tronco** (brotes juveniles y vigorosos que surgen directamente del tronco).

§ De la **raíz** (brotes muy juveniles que surgen con poca frecuencia de las raíces más superficiales que están a nivel del suelo y cercanos a la base del tronco).

A los brotes, agrupados según la clasificación anterior, se les aisló de forma rápida el extremo apical (longitud: ≈ 2.5 cm), el cual se seccionó longitudinalmente en dos mitades. De inmediato, cada una de las partes se colocó en **Nitrógeno líquido** o en una solución antioxidante estéril de **PVPP 250 mg.L⁻¹**. Se manipularon un total de 21 explantes de cada tipo. Este material vegetal se utilizó para evaluar el contenido de compuestos fenólicos de cada uno de los tipos de explantes.

Se colectó de igual forma un segundo lote de brotes, agrupados también según la clasificación topofísica anterior. A cada brote se le aisló el extremo apical, el cual se colocó en una solución antioxidante estéril de PVPP 250 mg.L⁻¹, pero en esta ocasión sin seccionar longitudinalmente. Este material vegetal se utilizó para realizar el establecimiento *in vitro* de las yemas apicales.

Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos: Los compuestos fenólicos se extrajeron siguiendo el procedimiento de Gurr *et al.* (1992). Se homogenizaron 100 mg de tejido vegetal, previamente macerados en nitrógeno líquido, con diez volúmenes de metanol. La suspensión fue centrifugada a 15 000 g por 15 minutos. El sobrenadante fue colectado para la cuantificación de los compuestos fenólicos solubles en la planta.

Para la cuantificación de compuestos fenólicos ligados a la pared celular, el precipitado se resuspendió en NaOH 2 mol.L⁻¹ (250 μ L) y se incubó 16 horas a 70 °C. El sobrenadante se neutralizó con HCl 2 mol.L⁻¹ (250 μ L) y la solución resultante se colectó para su cuantificación.

Para realizar la cuantificación de los compuestos fenólicos solubles en la planta se utilizó el procedimiento de Hoangland (1990) modificado. Al extracto vegetal (100 μ L) se le añadieron 100 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu. A los 5 min se le adicionó 1.0 mL de carbonato de sodio saturado y se dejó reposar una hora. Se leyó la absorbancia a 725 nm en un espectrofotómetro (Pharmacia LKB, Ultraspec II). El contenido de compuestos fenólicos se expresó en mg/g de masa fresca referidos a una curva patrón de ácido clorogénico (solución estándar a 0.05 mol.L⁻¹). El resultado permitió calcular el contenido de compuestos fenólicos totales en dependencia de la posición del explante en el árbol y del tipo de solución utilizada. En esta parte del experimento se adoptó un diseño bifactorial completamente aleatorizado, con tres repeticiones de cada tratamiento.

Establecimiento in vitro: En el laboratorio, los segmentos apicales, se lavaron con agua corriente y detergente antiséptico clorado HALOGEN ESPECIAL® 3.0% (v/v) durante 15 min. La desinfección superficial se realizó con bicloruro de mercurio 0.05% (m/v) + tres gotas de Tween 80, durante 15 min y tres enjuagues en una solución antioxidante estéril de PVPP 250 mg.L⁻¹ (Epígrafe 3.1.1.1). Las yemas apicales se aislaron y se inocularon en tubos de ensayo que contenían 10 mL de medio de cultivo semisólido de establecimiento constituido por las sales MS suplementadas con sacarosa 3% (m/v), mio-inositol 100 mg.L⁻¹, tiamina.HCl 1.0 mg.L⁻¹, PVPP 250 mg.L⁻¹, AIA 2.85 μmol.L⁻¹ y BAP, a la concentración de mejor respuesta del experimento anterior (Epígrafe 3.1.1.2).

Se inocularon un total de 25 explantes para cada tratamiento, con tres repeticiones del experimento. Todos los tratamientos se colocaron en las condiciones de luz artificial descritas en el epígrafe 3.0 y se adoptó un diseño monofactorial en bloque completamente aleatorizado. A los 45 d de cultivo se evaluaron el porcentaje de contaminación, fenolización y brotación, así como el número de brotes por explante. Para las tres primeras variables, se utilizaron como réplicas, cinco grupos aleatorios de cinco explantes cada uno. En la última variable se utilizó el explante individual.

3.1.2 *Multiplicación in vitro de los brotes provenientes de yemas de plantas de campo.*

3.1.2.1 *Efecto de la concentración de BAP.*

Para evaluar el efecto del BAP en la multiplicación *in vitro* de los brotes de guayabo y determinar la concentración a la que existe mejor respuesta, se llevó a cabo el siguiente experimento. Se tomó como referencia el procedimiento propuesto por Pérez *et al.* (2002), para brotes de semillas germinadas *in vitro* en el cultivar Enana Roja Cubana.

Se utilizaron brotes de la raíz de árboles de guayabo (2 años de edad) cultivados en el campo. Los extremos apicales (longitud ≈ 1.5 cm) se separaron de los brotes y se colectaron en una solución de PVPP 250 mg.L⁻¹, para su traslado al laboratorio, donde se lavaron y desinfectaron de igual modo que en el experimento anterior (Epígrafe 3.1.1.3). A continuación, las yemas apicales se aislaron y se colocaron en tubos de ensayo que contenían 10 mL de medio de establecimiento, definido según mejor resultado del epígrafe 3.1.1.2. Los tubos de ensayo se incubaron por un período de 90 d con un subcultivo a medio de cultivo fresco de similar composición a los 45 d.

Luego de este tiempo se transfirieron los explantes (brotes de longitud ≈ 0.8 cm, dos nudos visibles y un par de hojas abiertas) a frascos de cultivo que contenían 25 mL de diferentes variantes de medio

semisólido de multiplicación de brotes. Este estuvo constituido por las sales MS suplementadas con sacarosa 3% (m/v), mio-inositol 100 mg.L⁻¹, tiamina.HCl 1.0 mg.L⁻¹ y PVPP 250 mg.L⁻¹ además de diferentes concentraciones de **BAP (0.0, 2.2, 4.4, 6.7 y 8.9 μmol.L⁻¹)**. Se colocaron siete explantes por frasco de cultivo y se utilizaron seis frascos de cultivo en cada tratamiento, para un total de 42 explantes por tratamiento, con tres repeticiones del experimento. Todos los frascos de cultivo se incubaron en las condiciones de luz artificial descritas en el epígrafe 3.0 y se adoptó un diseño monofactorial en bloque completamente aleatorizado.

A los 45 d se realizó la evaluación del porcentaje de explantes con brotes axilares. También se evaluó el número de brotes por explante y el coeficiente de multiplicación (CM) a través de la ecuación:

$$CM = \frac{\text{Cantidad de segmentos de tallo final}}{\text{Cantidad de segmentos de tallo inicial}}$$

Para la primera variable se utilizó como réplica, el frasco de cultivo con siete explantes cada uno. En las dos últimas variables se utilizó el explante individual.

3.1.2.2 *Efecto del número de subcultivos.*

Este experimento se realizó con el objetivo de evaluar el efecto del número de subcultivos en la capacidad de multiplicación de los brotes de guayabo cv. Enana Roja Cubana. Para esto se utilizaron brotes provenientes del establecimiento *in vitro*. Estos se individualizaron y se transfirieron a frascos de cultivo que contenía 25 mL de medio de cultivo semisólido de multiplicación, constituido de acuerdo al mejor resultado del experimento anterior (Epígrafe 3.1.2.1). Se colocaron siete explantes por frasco de cultivo. Los frascos se incubaron en una cámara de luz artificial (Epígrafe 3.0) y a los 45 d se realizó un subcultivo o transferencia estéril.

En este primer subcultivo, los brotes se dividieron en segmentos de tallos (nodales o apicales). Los segmentos de tallos que se obtuvieron se cuantificaron y con este dato se calculó el coeficiente de multiplicación de acuerdo a la ecuación descrita en el experimento anterior (Epígrafe 3.1.2.1). Todos los explantes obtenidos se colocaron nuevamente en medio de cultivo fresco de multiplicación y se incubaron durante 45 d. Al finalizar este tiempo, se repitió la operación. Así, de manera sucesiva, se realizaron nueve subcultivos y en cada uno se determinó el coeficiente de multiplicación. El experimento se repitió tres veces y siempre se adoptó un diseño monofactorial en bloque completamente aleatorizado. Para el análisis estadístico se utilizaron como réplicas, seis frascos de cultivo con siete explantes cada uno, los que fueron evaluados en cada subcultivo.

3.1.3 Enraizamiento in vitro de los brotes de guayabo.

3.1.3.1 Efecto de reguladores del crecimiento de carácter auxínico.

Para evaluar el efecto de reguladores del crecimiento de carácter auxínico en el enraizamiento de los brotes de guayabo, se realizó el siguiente experimento, tomando como base los mejores resultados alcanzados en otros cultivares de guayabo (Jaiswal y Amin, 1987; Amin y Jaiswal, 1988). Se utilizaron brotes provenientes de la multiplicación *in vitro* de yemas de brotes de la raíz de árboles de campo con seis subcultivos. Los mismos se individualizaron y estandarizaron a una altura ≈ 1.5 cm, con tres nudos visibles y dos pares de hojas abiertas. Se colocaron, manteniendo polaridad positiva, en frascos de cultivo que contenían 25 mL de medio semisólido de enraizamiento constituido por las sales MS suplementadas con sacarosa 3% (m/v), mio-inositol 100 mg.L^{-1} , tiamina.HCl 1.0 mg.L^{-1} , y reguladores del crecimiento de carácter auxínico (**AIB** $0.98 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ y **ANA** $1.07 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$). Estos se añadieron en los dos primeros tratamientos **por separado (solos)**, en el tercero se utilizó la **combinación** de ambos y por último, en un cuarto tratamiento se estableció un **testigo** sin auxinas exógenas. Todos los tratamientos se colocaron bajo las condiciones de luz artificial descritas en el epígrafe 3.0 y se adoptó un diseño monofactorial en bloque completamente aleatorizado. Se colocaron siete explantes por frasco de cultivo y siete frascos por tratamiento, para un total de 49 explantes por tratamiento, con tres repeticiones del experimento. A los 45 d se realizó la evaluación del porcentaje de enraizamiento, el número de raíces por brote, la longitud de la raíz, la altura de los brotes y el número de nudos por brote. Para la primera variable se utilizó como réplica, el frasco de cultivo con siete explantes cada uno. Para las restantes variables se utilizó el explante individual.

3.1.3.2 Estudio histológico del proceso de enraizamiento.

Para determinar las características de las raíces surgidas en condiciones *in vitro*, se tomaron muestras de brotes cultivados en medio MS sin auxinas al inicio, a los siete y a los 15 d de cultivo. A los brotes se les cortó la porción basal del tallo que incluía los primordios de raíces. A continuación, se desarrolló un proceso histológico acorde al procedimiento descrito en el epígrafe 3.0. Los cortes seriados se tiñeron con la técnica de doble tinción safranina-fast green (Johansen, 1940). La observación de las muestras se realizó en el microscopio, donde se capturaron las imágenes correspondientes.

3.1.4 Aclimatización ex vitro de los brotes enraizados de guayabo.

Un total de 548 brotes enraizados *in vitro*, según resultados del experimento anterior (Epígrafe 3.1.3.1), con una altura de ≈ 3.0 cm y tres pares de hojas abiertas, se extrajeron de los frascos y se

lavaron con abundante agua corriente para eliminar los residuos del medio de cultivo. Luego se plantaron en bandejas de 144 cavidades (dimensiones: 52,5 x 29,5 x 4,0 cm [Largo-Ancho-Alto], volumen de cavidad: 25 cm³), con sustrato de zeolita 100% (Anexo I.a). Las bandejas se colocaron bajo cobertor de nylon con intensidad de luz de 550-600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (sombreo del 70%) y sistema de riego automatizado por microaspersión de 5 s cada 10 min en el período diurno, que garantizó una humedad relativa (HR) del 95%, durante los primeros 7 d. Después de este período, se redujo la frecuencia de riego a 27 s cada 30 min (HR=90%) hasta los 30 d, momento en que se realizó una evaluación del porcentaje de supervivencia. Luego de la evaluación, las plántulas que sobrevivieron, se transplantaron a bolsas de nylon polietileno que contenían una mezcla de suelo ferralítico rojo compactado eútrico (Hernández *et al.*, 1999) y cachaza 1:1 (v/v) (Anexo I.a). Las bolsas se colocaron en condiciones de mayor intensidad de luz (1800-2000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) y menor frecuencia de riego (1 riego/día, HR=75-80%), para iniciar la fase de vivero.

3.1.5 Estudio agro-morfológico en campo de plantas de guayabo obtenidas in vitro y plantas provenientes de estacas enraizadas.

Para comprobar la estabilidad fenotípica de las plantas de guayabo propagadas a través del procedimiento de organogénesis a partir de yemas de árboles de campo desarrollado en este estudio, se realizó una comparación a nivel agro-morfológico entre plantas obtenidas *in vitro* y plantas procedentes de estacas enraizadas del cultivar Enana Roja Cubana. Para esto se seleccionaron al azar 48 **vitroplantas** de guayabo provenientes del procedimiento de propagación *in vitro*. Las mismas llevaban tres meses en la fase de vivero, bajo las condiciones descritas en el experimento del epígrafe 3.1.4.1 y tenían una altura de aproximadamente 30 cm. Otro grupo de 48 plantas provenientes de **estacas enraizadas** cultivadas en condiciones semicontroladas de casa de cultivo, también se seleccionó. Al igual que en el caso anterior, tenían tres meses de aviveradas en bolsas de nylon en iguales condiciones y con una altura promedio similar.

Ambos grupos se plantaron en condiciones de campo sobre un suelo ferralítico rojo compactado eútrico (Hernández *et al.*, 1999) (Anexo I.b), con un marco de plantación de 4.5 x 1.5 m y una densidad de siembra de 1481 plantas/ha, en un área de 968 m² de la Estación Experimental “Juan Tomás Roig” de la Universidad de Ciego de Avila. Se utilizó un diseño de bloque al azar, con seis repeticiones de cada tratamiento, conformadas por dos parcelas de cuatro plantas (réplicas) cada una. Se trazó el campo en hileras de 12 plantas. En las evaluaciones se muestrearon todas las plantas del experimento.

Las labores agrícolas se ejecutaron de acuerdo con el Instructivo Técnico para el guayabo Enana Roja Cubana (MINAG, 2004). A los tres meses de plantadas en el campo se iniciaron las evaluaciones. La primera se realizó el 11 de mayo del 2005 y la última el 11 de marzo del 2006 (11 meses). Estas evaluaciones estuvieron encaminadas a comparar la fenología del cultivo (Tabla 1) y la bromatología del fruto (Tabla 2). En todos los casos se utilizaron variables morfológicas señaladas en la literatura (Collado *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2005c) y descriptores destacados según las normas UPOV (1987) para el cultivo del guayabo. Las condiciones climáticas bajo las cuales se desarrolló la investigación se monitorearon por el INSMET de la provincia de Ciego de Avila (Anexo II).

3.2 Embriogénesis somática *in vitro* a partir de embriones cigóticos inmaduros del guayabo cv. Enana Roja Cubana.

3.2.1 Inducción del callo con estructuras embriogénicas a partir de embriones cigóticos.

3.2.1.1 Efecto del tipo y concentración de auxina en la inducción del callo con estructuras embriogénicas.

Con el objetivo de inducir la formación de callo con estructuras embriogénicas en el guayabo cv. Enana Roja Cubana se llevó a cabo el siguiente experimento, tomando como referencia resultados anteriores en otros cultivares de guayabo (Akhtar *et al.*, 2000) y en otras especies *Myrtaceae* (Canhoto *et al.*, 1999; Guerra *et al.*, 2001; Dal Vesco y Guerra, 2001). Para esto se colectaron frutos inmaduros de 3.5-4.0 cm de diámetro ecuatorial, consistencia dura y color verde intenso, de árboles de dos años de edad, que fueron elegidos de acuerdo a sus características productivas y fitosanitarias. Los frutos se sometieron a un proceso de lavado con agua corriente y detergente comercial durante 30 min. En la cabina de flujo laminar se les realizó una desinfección superficial con bicloruro de mercurio 0.05% (m/v) durante 20 min. Luego de tres enjuagues con agua destilada estéril, los frutos se fraccionaron en dirección al eje longitudinal en cuatro partes iguales para facilitar la extracción del endocarpio que sostiene las semillas. Las fracciones se colocaron en una solución antioxidante estéril de PVPP 5.0 g.L⁻¹ durante una hora. Luego las semillas se separaron del endocarpio y con la ayuda de una lupa, pinzas, bisturí y aguja enmangada, se realizó la extracción del embrión cigótico en condiciones asépticas.

Los embriones cigóticos cosechados, se inocularon en frascos de cultivo que contenían 25 mL de medio semisólido de inducción y formación de callo constituido por la formulación basal WPM suplementada con mio-inositol 100 mg.L⁻¹, tiamina.HCl 1.0 mg.L⁻¹, glutamina 584 mg.L⁻¹, sacarosa

30 g.L⁻¹ y PVPP 250 mg.L⁻¹. Como tratamientos se utilizaron dos reguladores del crecimiento con carácter auxínico, el **2,4-D** y el **Picloram**, añadidos al medio de cultivo en concentraciones de **0.0, 5.0, 10.0, 15.0 y 20.0 μmol.L⁻¹**. El uso de las sales WPM se llevó a cabo a partir del resultado de ensayos preliminares realizados en comparación con las formulaciones basales MS y LPm (datos no mostrados).

Se colocaron cinco explantes (embriones cigóticos) por frasco de cultivo, a razón de cinco frascos por tratamiento, para un total de 25 explantes por tratamiento, con dos repeticiones del experimento. Los frascos se incubaron en condiciones de oscuridad descritas en Procedimientos Generales (Epígrafe 3.0) y se adoptó un diseño bifactorial en bloque completamente aleatorizado. Durante todo el tiempo de cultivo se realizó la observación y descripción morfológica de las estructuras formadas. A los 60 d de cultivo se realizó la evaluación del porcentaje de formación de callo primario y callo con estructuras embriogénicas. Para el análisis estadístico de los datos porcentuales se utilizó como unidad experimental el frasco de cultivo con cinco explantes. En la última variable evaluada, se utilizó el explante individual.

3.2.1.2 Efecto de la edad y tamaño del fruto en la inducción del callo con estructuras embriogénicas.

Con el objetivo de determinar el estado de desarrollo del embrión cigótico, de mejor respuesta en la inducción del callo con estructuras embriogénicas, se colectaron en árboles de campo (2 años de edad), frutos que tenían **25, 45 y 65 d** de edad después de la antesis y se les realizó una medición del diámetro ecuatorial, respectivamente. A continuación se sometieron a un proceso de lavado, desinfección, extracción de las semillas y escisión de los embriones cigóticos, similar al descrito en el experimento anterior (Epígrafe 3.2.1.1).

Los embriones cigóticos extraídos, se inocularon en frascos de cultivo que contenían 25 mL de medio semisólido de inducción y formación de callo constituido por la formulación descrita en el experimento anterior (Epígrafe 3.2.1.1), pero esta vez suplementada con el regulador del crecimiento y la concentración de mejores resultados. Se colocaron cinco explantes (embriones cigóticos) por frasco de cultivo, a razón de cinco frascos por tratamiento, para un total de 25 explantes por tratamiento, con dos repeticiones del experimento. Los frascos se colocaron en condiciones de oscuridad (Epígrafe 3.0) y se adoptó un diseño monofactorial en bloque completamente aleatorizado. Durante el experimento se realizó la observación morfológica del explante. A los 15 d de cultivo se evaluó el porcentaje de contaminación (hongo y bacteria) y fenolización del explante. A los 60 d se

evaluó el porcentaje de formación del callo primario y el callo con estructuras embriogénicas. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó como unidad experimental el frasco de cultivo con cinco explantes.

3.2.2 Proliferación del callo con estructuras embriogénicas de guayabo.

3.2.2.1 Efecto de la concentración de 2,4-D sobre la proliferación del callo con estructuras embriogénicas.

Con el objetivo de determinar la concentración de 2,4-D adecuada para promover el mayor crecimiento o proliferación del callo con estructuras embriogénicas, se desarrolló el siguiente experimento. Se colectaron frutos según el mejor resultado del experimento anterior (Epígrafe 3.2.1.2) y se realizó un procedimiento de inducción del callo con estructuras embriogénicas acorde al mejor resultado del primer experimento (Epígrafe 3.2.1.1). Se colocaron cinco embriones cigóticos por frasco de cultivo y un total de 40 frascos.

A los 60 d de cultivo se determinó la masa fresca de los callos formados mediante pesada directa en balanza analítica (SARTORIUS® TE64). A continuación, se realizó el primer subcultivo para promover la proliferación del tejido con estructuras embriogénicas. Para esto, se transfirieron los callos a diferentes variantes de medio de cultivo semisólido de proliferación, constituidos por las sales de la formulación basal WPM suplementada con mio-inositol 100 mg.L⁻¹, tiamina.HCl 1.0 mg.L⁻¹, glutamina 584 mg.L⁻¹, sacarosa 30 g.L⁻¹ y tres concentraciones de **2,4-D (2.5, 5.0 y 7.5 μmol.L⁻¹)**. Estos tejidos se mantuvieron durante 90 d en igual medio semisólido de proliferación (según cada tratamiento) con tres subcultivos cada 30 d de todo el callo de manera íntegra. Un cuarto grupo de callos, inducidos inicialmente como los anteriores, no recibió subcultivos de proliferación durante los 90 d de duración del experimento. Este tratamiento se denominó **testigo**.

En todos los casos se colocaron cinco callos por frasco, a razón de cuatro frascos por tratamiento, para un total de 20 explantes por tratamiento, con tres repeticiones del experimento. Para la transferencia a medio de cultivo fresco de los callos se utilizó una espátula-cucharilla de acero inoxidable esterilizada previamente y un procedimiento que requirió laboriosidad por las características friables del callo. Todos los tratamientos se colocaron bajo condiciones de oscuridad (Epígrafe 3.0) y se utilizó un diseño monofactorial en bloque completamente aleatorizado. A los 90 d de iniciada la proliferación de los callos se determinó, para cada tratamiento, la masa fresca final de éstos de igual forma que al inicio. Este dato permitió calcular el incremento de la masa fresca que

ocurrió durante el período de proliferación. Adicionalmente, se realizó la observación morfológica del callo y se evaluó el porcentaje de formación y número de embriones somáticos en etapas avanzadas de desarrollo (torpedo y cotiledonar). Para el análisis estadístico de la variable porcentual se utilizó como unidad experimental el frasco de cultivo con cinco explantes. Para las restantes variables, se utilizó el explante de manera individual.

3.2.3 Histodiferenciación y desarrollo de los embriones somáticos de guayabo.

3.2.3.1 Efecto de la sacarosa y el ABA en la histodiferenciación y calidad de los embriones somáticos regenerados.

Este experimento se llevó a cabo con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y ABA sobre la histodiferenciación y desarrollo de los embriones somáticos del guayabo cv. Enana Roja Cubana. El uso de los tipos y concentraciones de reguladores del crecimiento se basó fundamentalmente en trabajos anteriores desarrollados en *Feijoa sellowiana* (Alvelos *et al.*, 2000) y en otras especies leñosas (Agarwal *et al.*, 2004; Perán-Quesada *et al.*, 2004; Mauri y Manzanera, 2004). El trabajo se realizó en dos partes, la primera para evaluar el efecto de los tratamientos en la producción de embriones somáticos, y la segunda para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la calidad de los embriones regenerados, en función del comportamiento de éstos durante la germinación.

Histodiferenciación: Se colectaron porciones de callo con estructuras embriogénicas (≈ 100 mg masa fresca, $0.75-0.90$ cm³), que recibieron tres subcultivos en medio de cultivo semisólido de proliferación (2,4-D 7.5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) según resultados del experimento anterior (Epígrafe 3.2.2.1). Se retiraron los embriones somáticos torpedo-cotiledonar visibles en la superficie. Los callos se transfirieron a frascos de cultivo que contenían 25 mL de medio semisólido de histodiferenciación. El mismo estuvo constituido por las sales WPM suplementadas con tiamina.HCl 1.0 mg.L⁻¹, glutamina 584 mg.L⁻¹, mio-inositol 100 mg.L⁻¹. Como tratamiento se utilizaron diferentes combinaciones de **sacarosa (30.0 y 60.0 g.L⁻¹)** y **ABA (0.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 y 25.0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$)** añadidas al medio de cultivo.

Se colocaron cinco porciones de callo por frasco de cultivo y un total de tres frascos por tratamiento. Luego de 30 d de cultivo, los callos se transfirieron a medio semisólido MS sin reguladores del crecimiento. Todos los tratamientos se colocaron en condiciones de oscuridad (Epígrafe 3.0) y se adoptó un diseño bifactorial en bloque completamente aleatorizado. A los 30 d de cultivo se realizó

la observación morfológica del explante y se cuantificó el número de embriones somáticos en etapas avanzadas (torpedo y cotiledonar) por callo. Para el análisis estadístico, se utilizó como unidad experimental el callo de manera individual.

Germinación: Se aislaron y cosecharon todos los embriones somáticos en etapas torpedo y cotiledonar, manteniendo la clasificación de los tratamientos anteriores de histodiferenciación. Luego se inocularon en placas de Petri que contenían 20 mL de medio de cultivo semisólido de germinación constituido por las sales MS, al 50% de concentración normal, suplementadas con sacarosa 30 g.L⁻¹, tiamina.HCl 1.0 mg.L⁻¹ y mio-inositol 100 mg.L⁻¹. No se utilizaron reguladores del crecimiento. Se incubaron un total de 15 embriones por placa de Petri, a razón de tres placas por tratamiento. Las placas se colocaron bajo condiciones de luz artificial (Epígrafe 3.0) y se utilizó un diseño bifactorial en bloque completamente aleatorizado. Durante el cultivo se realizó la observación morfológica del explante (embrión somático) y a los 30 d se evaluó el porcentaje de germinación, clasificada en: normal (crecimiento simultáneo de radícula e hipocótilo) y fuera de tipo (Perán-Quesada *et al.*, 2004), que permitió calcular el porcentaje de germinación total como la suma de las anteriores. También se evaluó el porcentaje de formación de embriones secundarios durante la germinación. Para éstas variables se utilizó como unidad experimental la placa de Petri con 15 embriones somáticos cada una.

3.2.3.2 *Efecto del tamaño de los agregados celulares en la histodiferenciación de los embriones somáticos en medio de cultivo líquido.*

Con los objetivos de facilitar la manipulación de los callos con estructuras embriogénicas e incrementar los rendimientos de la histodiferenciación, en cuanto al número de embriones somáticos torpedo-cotiledonar, se llevó a cabo el siguiente experimento. Se acopió aproximadamente 1 g de callo con estructuras embriogénicas, con tres subcultivos cada 30 d en medio semisólido de proliferación (2,4-D 7.5 µmol.L⁻¹) según resultados del experimento del epígrafe 3.2.2.1. A continuación se retiraron los embriones somáticos torpedo-cotiledonar visibles en la superficie. Seguidamente los callos se inocularon en un frasco Erlenmeyer de 100 mL de capacidad, que contenía 10 mL de medio de cultivo de proliferación (2,4-D 7.5 µmol.L⁻¹) (Epígrafe 3.2.2.1), pero en esta ocasión en estado líquido. Esta operación se repitió hasta preparar un total de 12 Erlenmeyers. A los siete días de cultivo se realizó un subcultivo mediante la renovación total del medio de cultivo líquido por otros 10 mL de medio fresco de similar composición. Siete días después se repitió la operación hasta efectuar tres subcultivos.

A los 21 d de cultivo en medio líquido se mezclaron las suspensiones celulares heterogéneas de cuatro Erlenmeyers. Inmediatamente este volumen (40 mL) se cribó por tres tamices de nylon SPECTRUM[®] (tamaño del poro de 250, 500 y 1000 μm) esterilizados previamente en autoclave. Esto dio como resultado cuatro fracciones de agregados celulares de diferentes tamaños (tratamientos): **I (0-250 μm)**, **II (250-500 μm)**, **III (500-1000 μm)** y **IV (>1000 μm)**. Cada una de estas fracciones se inoculó por separado en frascos Erlenmeyers de 100 mL que contenían 20 mL de medio de cultivo de histodiferenciación, de composición similar al utilizado en el experimento anterior (Epígrafe 3.2.3.1), pero en esta ocasión en estado líquido y suplementado con ABA 15.0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ y sacarosa 60.0 g.L^{-1} . Esta operación se repitió dos veces más con los ocho Erlenmeyers restantes. Se realizaron tres subcultivos mediante la renovación total del medio de cultivo líquido, por igual volumen, cada siete días.

A los 21 d de cultivo en medio líquido de histodiferenciación, se realizó un subcultivo mediante la renovación total del medio y se añadió igual volumen de medio líquido MS sin reguladores del crecimiento. De igual forma se realizaron tres subcultivos mediante la renovación total del medio por igual volumen, cada siete días. Todos los cultivos en medio líquido se colocaron en una zaranda orbital Biozar-2000 (RETOMED[®]), a 100 rpm en la oscuridad, a una temperatura de $26\pm 2^\circ\text{C}$. Se adoptó un diseño monofactorial en bloque completamente aleatorizado.

Durante todo el cultivo se realizó la observación morfológica y se evaluó el desarrollo de las suspensiones celulares. Luego de 21 d, en medio líquido MS sin reguladores del crecimiento, se realizó la evaluación del experimento. Para esto se agitó el Erlenmeyer y se tomó una alícuota (1.0 mL) del cultivo. La muestra se esparció sobre una placa de Petri y mediante un estereo-microscopio se realizó el conteo del número de embriones somáticos clasificados de acuerdo a su etapa de desarrollo en: globular-oblongo, corazón, torpedo y cotiledonar. Este proceso de conteo se repitió tres veces para cada Erlenmeyer de cultivo, lo que arrojó un total de nueve valores por tratamiento. Se realizó además un análisis de la viabilidad celular de los embriones somáticos y de los agregados celulares mediante la técnica de fluorescencia a la luz ultravioleta (UV) con el uso del fluorescein di-O-acetato (FDA) según el método propuesto por Breeuwer *et al.* (1995). Para el análisis estadístico del número de embriones somáticos por mililitro, se utilizó como unidad experimental cada valor de conteo realizado.

3.2.4 Germinación y conversión en planta de los embriones somáticos.

3.2.4.1 Comparación de la germinación y conversión en planta de los embriones somáticos histodiferenciados en medio semisólido y en medio líquido.

Con el objetivo de evaluar comparativamente la calidad de los procesos de histodiferenciación ocurridos en condiciones de medio de cultivo semisólido y líquido, se realizó el siguiente estudio.

Germinación: Embriones somáticos torpedo y cotiledonar, obtenidos en medios de cultivo de histodiferenciación en estados **semisólido** (Epígrafe 3.2.3.1) y **líquido** (Epígrafe 3.2.3.2) se cosecharon individualmente y se inocularon en placas de Petri que contenían 20 mL de medio de cultivo semisólido de germinación, constituido por las sales MS, al 50% de la concentración normal, suplementadas con sacarosa 30 g.L⁻¹, tiamina.HCl 1.0 mg.L⁻¹ y mio-inositol 100 mg.L⁻¹. No se utilizaron reguladores del crecimiento hormonales (Epígrafe 3.2.3.1). Un total de tres placas de Petri por tratamiento se colocaron bajo condiciones de luz artificial (Epígrafe 3.0) y se utilizó un diseño monofactorial en bloque completamente aleatorizado. Se inocularon 15 embriones somáticos por placa de Petri, con tres repeticiones del experimento. Durante todo el cultivo se realizó la observación morfológica del desarrollo de los embriones somáticos. A los 30 d de cultivo se evaluó el porcentaje de germinación total y normal (Perán-Quesada *et al.*, 2004). Para el análisis estadístico se utilizó como unidad experimental la placa de Petri con 15 embriones somáticos.

Conversión: Luego de las evaluaciones anteriores, se extrajeron 108 plántulas germinadas de cada uno de los tratamientos (semisólido y líquido) y se sometieron a un proceso de lavado con agua corriente para eliminar los residuos del medio de cultivo. Luego se plantaron en bandejas de 144 cavidades con sustrato de zeolita 100% (ver Anexo I). Las bandejas se colocaron bajo cobertor con intensidad de luz de 550-600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y sistema de riego automatizado por microaspersión de 5 s cada 10 min (HR=95%) en el período diurno, durante los primeros 7 d. Después de este tiempo se redujo la frecuencia de riego a 27 s cada 30 min (HR=90%), hasta los 30 d de cultivo. Se utilizó un diseño monofactorial en bloque al azar, con nueve repeticiones de 12 plántulas cada una. Al finalizar este período de cultivo se evaluó el porcentaje de supervivencia y seguidamente se realizó el trasplante de las vitroplantas a bolsas de nylon polietileno, en condiciones similares a las descritas en el epígrafe 3.1.4, para iniciar la fase de vivero. A los 30 d se realizó la evaluación del porcentaje de conversión en planta, tomando como referencia el número inicial de embriones somáticos colocados en germinación.

3.2.5 Estudio histológico del proceso de embriogénesis somática en el guayabo.

Muestreo del material vegetal: Se tomaron muestras de tejido vegetal en cada una de las etapas del proceso de embriogénesis somática. Para ello se colectaron, con la ayuda de pinzas y/o espátulas, explantes iniciales, fracciones de callo, grupos de embriones somáticos y embriones aislados en diferentes etapas de desarrollo.

En la fase de inducción del callo con estructuras embriogénicas, se colectaron callos después de 30 y 60 d de cultivo. Para muestrear la fase de proliferación se colectaron fracciones de callos con estructuras embriogénicas luego de dos subcultivos en esta fase. La histodiferenciación de los embriones somáticos se muestreó mediante la colecta de fracciones de callo con embriones somáticos visibles en su superficie, a los 30 d de cultivo, tanto de los cultivos en medio semisólido como en medio líquido. Adicionalmente se muestrearon embriones aislados en etapa cotiledonar y grupos o agregados de embriones somáticos cultivados en medio líquido.

Proceso histológico y toma de imágenes: Para el procesamiento histológico se desarrolló un procedimiento similar al descrito en el epígrafe 3.0. Los cortes seriados se tiñeron con la técnica de doble tinción hematoxilina-eosina (Johansen, 1940). La observación de los cortes se realizó al microscopio y se captaron las imágenes correspondientes (Epígrafe 3.0).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Organogénesis *in vitro* a partir de yemas de árboles de campo del guayabo cv. Enana Roja Cubana.

4.1.1 Establecimiento *in vitro* de yemas de plantas de guayabo cultivadas en el campo.

4.1.1.1 Efecto del tiempo de desinfección con bicloruro de mercurio.

En la tabla 3 se observan los resultados del efecto del tiempo de desinfección de las yemas etioladas de las plantas de campo de guayabo, en el establecimiento *in vitro*, 10 d después de iniciado el cultivo. El tiempo de exposición de los explantes a la acción del bicloruro de mercurio (0.05%) influyó significativamente en los resultados de las variables evaluadas.

Tabla 3. Efecto del tiempo de desinfección en bicloruro de mercurio 0.05% (m/v) sobre las yemas de árboles de campo en el establecimiento *in vitro*, a los 10 días de iniciado el cultivo.

Tiempo de desinfección (min.)	Contaminación (%)		Fenolización (%)		Supervivencia (%)	
	^x Media	SR	^x Media	SR	^x Media	SR
0 (testigo)	100.0	23.0 a	76.7	12.8	0.0	0.0 c
5	100.0	23.0 a	76.7	14.1	0.0	0.0 c
10	86.7	18.2 a	80.0	14.3	3.3	13.3 b
15	43.3	8.1 b	86.7	18.2	26.7	26.5 a
20	30	5.3 b	86.7	18.2	6.7	15.7 b
Significación	*		ns		*	
EEx	5.88		3.02		2.25	
CV	0.201		0.207		0.877	

(Para SR con letras desiguales, las medias difieren significativamente según pruebas no-paramétricas de Kruskal Wallis y Student-Newman-Keuls, para $p < 0.05$. SR: suma de rango, EEx: error estándar de la media, CV: coeficiente de variación, ns: no significativo, ^x cada valor representa el promedio de 5 grupos de 5 yemas cada uno).

El porcentaje de contaminación disminuyó significativamente cuando se incrementó el tiempo de desinfección por más de 10 min. La contaminación más baja se obtuvo con un tiempo de 20 min. Este tratamiento mostró diferencias significativas con el resto de los tiempos de desinfección, excepto con 15 min donde también se logró un control adecuado de la contaminación. Los tiempos de desinfección inferiores o iguales a 10 min fueron ineficaces y no mostraron diferencias con el tratamiento testigo (no desinfectados).

Para todos los tiempos de desinfección, se mostraron altos índices de oxidación fenólica en los tejidos superficiales y/o exudación de estos compuestos al medio de cultivo, sin diferencias estadísticas entre sí. Esto demuestra que este proceso de fenolización está más relacionado con las

características propias del tejido del guayabo (León *et al.*, 1998), que con el tratamiento de desinfección realizado (Khattak *et al.*, 1990). No obstante, se pudo observar una mayor intensidad en la coloración pardo-rojiza oscura de los explantes y de sus exudados al medio de cultivo, cuando el tiempo de desinfección fue mayor (datos no mostrados). Por otro lado, el subcultivo frecuente cada 48 h al que fueron sometidos los explantes, si bien permitió eliminar los compuestos que fueron exudados al medio de cultivo, no solucionó el problema de la fenolización para ninguno de los tratamientos. De manera general el comportamiento de la fenolización coincidió con lo señalado en trabajos precedentes para otros cultivares de guayaba (Jaiswal y Amin, 1987; Amin y Jaiswal, 1987, 1988). Esta problemática se tratará con mayor profundidad en experimentos subsiguientes.

En cuanto al porcentaje de supervivencia de los explantes, se apreció que los valores alcanzados fueron bajos. Con un tiempo de desinfección de 15 min se logró el único valor superior al 25%, el cual reflejó diferencias significativas con el resto de los tratamientos y constituyó el mejor resultado. Para 20 min, la pobre supervivencia fue causada por quemaduras superficiales que provocaron el oscurecimiento y la necrosis del tejido. En cambio, para los tiempos por debajo de 15 min, fue causada principalmente por la acción perjudicial de microorganismos contaminantes.

El uso de material vegetal procedente de plantas leñosas, de condición adulta, y cultivadas directamente en el campo se consideran las causas principales de los resultados que se alcanzaron en este experimento para las yemas de guayabo. Estos órganos presentan una alta pubescencia en su superficie lo que hace que muchos microorganismos, que forman parte de su microflora epifítica natural (Acosta *et al.*, 2002), encuentren posibilidades de crecimiento.

Los microorganismos contaminantes, una vez en contacto con el medio de cultivo y en el mejor de los casos, comienzan un crecimiento acelerado que consume rápidamente los nutrientes del medio, altera sus propiedades y afecta el desarrollo normal de los tejidos vegetales. En el peor de los casos, estos microorganismos excretan toxinas y/o utilizan el contenido celular como sustrato para su propio desarrollo (Leifert *et al.*, 1994). Por tanto, la acción del agente desinfectante se ve limitada, en primer lugar, porque necesita poseer una baja tensión superficial que le permita llegar a toda la superficie, y segundo, porque se requiere en una concentración y en un tiempo de acción que elimine los microorganismos y provoque el menor daño a los tejidos superficiales. Encontrar el punto intermedio de este compromiso resulta en ocasiones complicado (Khattak *et al.*, 1990; Ramírez *et al.*, 1999a).

Para la propagación *in vitro* de numerosas especies leñosas, de condición adulta y cultivadas en condiciones naturales, es frecuente el uso del bicloruro de mercurio como elemento fundamental para lograr la asepsia necesaria del material vegetal (Bhatt y Dhar, 2004; Anis *et al.*, 2005; Hajari *et al.*, 2005). En el guayabo, se ha utilizado con regularidad el bicloruro de mercurio con tiempos de desinfección de 2-20 min como parte de complejos y costosos protocolos de desinfección que utilizan adicionalmente, mezclas de antibióticos y fungicidas, precedidos de lavados con detergentes antisépticos clorados (Jaiswal y Amin, 1987; Amin y Jaiswal, 1987, 1988). Su uso se realizó siempre y cuando otros agentes desinfectantes clorados, menos peligrosos para la salud humana y el ambiente, fueron inefectivos (Khattak *et al.*, 1990; Ramírez *et al.*, 1999a; Acosta *et al.*, 2002). En este experimento, para el cultivar Enana Roja Cubana, también se desarrollaron ensayos preliminares que justifican su uso (Nápoles, 2003).

En el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*P. guajava* L.) y cas (*P. friedrichsthalianum* (Berg.) Nierdz) se utilizaron diferentes agentes desinfectantes entre los que se destacó el bicloruro de mercurio con un tiempo de desinfección de 10-15 min (Ramírez *et al.*, 1999a). Sin embargo, estos autores no lograron controlar los microorganismos contaminantes sin afectar la viabilidad de los explantes. Ellos indicaron que 14 d después de la siembra muchos de los explantes declarados como viables y no contaminados, murieron o se contaminaron, lo cual repercutió en que ninguno de los tratamientos se considerase efectivo. Por el contrario, los resultados alcanzados en este experimento para el guayabo cv. Enana Roja Cubana, muestran que se logró controlar la contaminación de las yemas y mantener un 26.7% de supervivencia después de 10 d de implantadas.

A pesar de lo anterior, el uso de material procedente de plántulas de pocas semanas de edad (Papadauto *et al.*, 1990), de semillas germinadas *in vitro* (Mohamed-Yassen *et al.*, 1995) o de plantas jóvenes cultivadas en condiciones semicontroladas (Ali *et al.*, 2003), continúa siendo más efectivo en la eficiencia del establecimiento. Precisamente los problemas relacionados con las pérdidas del material de campo en esta especie, conllevaron al uso de material de semilla como vía alternativa (Pérez *et al.*, 2002; Ali *et al.*, 2003), a pesar de que no se logra una clonación verdadera de plantas con características agronómicas superiores (Collado *et al.*, 2002).

En este experimento, de todos los tiempos de desinfección con bicloruro de mercurio 0.05% (m/v) estudiados, los mejores resultados se obtuvieron con 15 min. A partir de este resultado se pudieron

cultivar bajo condiciones *in vitro* las yemas de campo del guayabo ‘Enana Roja Cubana’, cuyo desarrollo se expone en el experimento subsiguiente.

4.1.1.2 Efecto de la concentración de BAP.

A los 45 d de cultivo de los explantes, ápices y segmentos nodales que sobrevivieron a la implantación en el experimento anterior, se observó el crecimiento de brotes en las diferentes variantes de medio semisólido de establecimiento con diferentes concentraciones de BAP, combinadas con AIA $2.85 \mu\text{mol.L}^{-1}$. El análisis de varianza (ANOVA bifactorial) realizado a las variables, porcentaje de brotación y longitud del brote, no mostró diferencias significativas en la respuesta morfogénica para la interacción de los factores concentración de BAP y tipo de explante. Sin embargo, en el análisis de ambos factores por separado, sí se obtuvieron diferencias estadísticas significativas (Tabla 4).

En cuanto al factor concentración de BAP, se observó que la adición de esta citoquinina al medio de cultivo de establecimiento favoreció significativamente el porcentaje de brotación de las yemas. Con la concentración de $4.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ se alcanzó el mayor porcentaje de brotación, significativamente superior al alcanzado en el resto de los tratamientos, a excepción de $6.7 \mu\text{mol.L}^{-1}$, el cual a su vez, no mostró porcentajes de brotación estadísticamente diferentes al tratamiento de $2.2 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Para la variable longitud del brote, el BAP en concentraciones de 2.2 y $4.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ mostró un efecto favorable y estadísticamente superior al tratamiento sin citoquinina ($0.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$). La mayor longitud del brote, significativamente superior al resto de los tratamientos, se alcanzó con el BAP $2.2 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Para la concentración de BAP $6.7 \mu\text{mol.L}^{-1}$, ocurrió una significativa disminución de la longitud de los brotes, que no mostró diferencias estadísticas con el tratamiento sin citoquinina ($0.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

Con relación al efecto del factor tipo de explante (Tabla 4), se observó que los segmentos nodales superaron significativamente a los explantes de ápices en cuanto al porcentaje de brotación. Por el contrario, para la variable longitud del brote, los explantes de ápices alcanzaron un valor significativamente superior a los brotes emitidos por los segmentos nodales. Este resultado estuvo influenciado por la ruptura mecánica de la dominancia apical en el explante de segmento nodal, aspecto que le proporcionó ventaja con respecto al explante de ápice. Al mismo tiempo, el segmento nodal tiene dos yemas axilares con potencialidad de brotar y crecer (Figura 2a y b), característica que acrecentó esa ventaja.

Una dificultad fundamental que existe en la etapa de establecimiento *in vitro* es romper el estado de quiescencia de las yemas en los explantes y la principal vía o método utilizado para lograrlo es la inoculación de éstos en medios de cultivo ricos en citoquininas exógenas (Romano *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2004; Antunes De Moraes *et al.*, 2004). Por esa razón, los esfuerzos en este experimento estuvieron dirigidos a promover la brotación en condiciones *in vitro* con el uso del BAP en combinación con AIA $2.85 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

El mejor resultado se alcanzó con la concentración de $4.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, basado fundamentalmente en la importancia que tiene para la fase de establecimiento la brotación de las yemas. Este resultado coincide con varios trabajos realizados en otros cultivares de guayabo (Amin y Jaiswal, 1987, 1988; Siddiqui y Farooq, 1996; Ramírez y Salazar, 1997, Singh *et al.*, 2001), en donde el BAP $4.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ constituyó la mejor variante para el establecimiento *in vitro* de material vegetal de plantas de campo o de casas de cultivo. En éstos, el uso de auxinas es menos frecuente. Sin embargo, hay autores que recomiendan la adición de AIA $0.1-0.5 \text{ mg.L}^{-1}$, pues permite la formación de brotes con mayor calidad, al parecer porque reemplaza el déficit auxínico creado en el balance hormonal endógeno, en especial para los segmentos nodales (Jaiswal y Amin, 1987).

El BAP es un análogo sintético de las citoquininas naturales y tiene un amplio uso en el cultivo *in vitro*, con especial énfasis en la micropropagación (George, 1993). Este regulador del crecimiento tiene actividad citoquinínica, pues estimula la división celular y los procesos de desarrollo. Adicionalmente, en los tejidos tratados, promueve la ruptura de la dominancia apical y estimula el crecimiento y desarrollo de las yemas axilares (Salisbury y Ross, 1992; George, 1993). Como parte de ese efecto inhibitor de la dominancia apical, produce frecuentemente la disminución del tamaño de los brotes (Singh *et al.*, 2002b; Teixeira *et al.*, 2004). Estos aspectos justifican la respuesta de los explantes de guayabo a las diferentes concentraciones de BAP utilizadas.

Con relación al tipo de explante, se comprobó que para el segmento nodal la adición de citoquininas exógenas actuó sinérgicamente con el balance hormonal endógeno que ya era favorable a las citoquininas tras la separación mecánica del ápice. Esto se demostró en el menor tamaño de los brotes emitidos por este tipo de explante (Tabla 4) y adicionalmente por la brotación de yemas axilares que ocurrió en el medio sin citoquinina solo para este tipo de explante, a pesar de la presencia de AIA $2.85 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (datos no mostrados). Se puede plantear además que existió competencia entre las yemas axilares o laterales en brotación por ejercer la dominancia apical y

controlar el crecimiento. Este aspecto actuó también en detrimento de la longitud que pudieron alcanzar los brotes emitidos.

Para los ápices, la yema apical se mantuvo en crecimiento activo con un balance hormonal favorable a las auxinas (ayudado además por la adición exógena de AIA $2.85 \mu\text{mol.L}^{-1}$) de esta forma se mantuvo el dominio de las yemas axilares y se limitó su brotación. Del mismo modo, fue la dominancia apical la que favoreció el crecimiento de los brotes en este tipo de explante. La brotación de las yemas axilares en el explante de ápice, solo se logró a la concentración de BAP $6.7 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (datos no mostrados), bajo un fuerte efecto inhibitor de la dominancia apical por parte de la citoquinina a esa concentración.

En trabajos previos con el cultivar Enana Roja Cubana, se evaluó la influencia de diferentes tipos de citoquininas en la fase de multiplicación de brotes obtenidos a partir de semillas germinadas *in vitro* (Pérez *et al.*, 2002). En este estudio se reconoció al BAP como el regulador del crecimiento de mejores resultados y el más apropiado para la multiplicación *in vitro*. Estos autores también encontraron que los brotes de explantes de ápice alcanzaron siempre mayor longitud independientemente de la citoquinina utilizada. Con el BAP $2.2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ se lograron los mayores resultados tanto para ápices (2.17 cm) como para nudos (1.0 cm). Al comparar esos valores de longitud del brote, con el de este experimento, se observó que son superiores. El origen de tal diferencia pudiera estar sustentado por el estado fisiológico del tipo de explante que se utilizó en cada caso. Los ápices de brotes de semillas germinadas *in vitro*, poseen un estado ontogénico más juvenil que el material vegetal de yemas de plantas adultas, utilizado en este experimento.

En la fase de establecimiento *in vitro*, la longitud de los brotes no se considera el aspecto más relevante en la eficiencia, sino, el porcentaje de brotación. Por eso, teniendo en cuenta los resultados en estas dos variables, se determinó que la concentración de BAP $4.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ es la mejor. Con ésta se logró una alta brotación de las yemas y además los brotes surgidos tuvieron un tamaño intermedio. Por otro lado, se reconoció a los explantes de segmentos nodales como los de mejor comportamiento en el establecimiento *in vitro*. Sin embargo, esto no quiere decir que se debe renunciar al uso de los segmentos de ápices durante la implantación, pues se trata de un explante que forma parte, al igual que el segmento nodal, del material vegetal utilizado. Su uso no conlleva a la búsqueda de otro procedimiento adicional y puede garantizar hasta un 30% de explantes establecidos.

Con estos resultados se obtuvo un medio de cultivo favorable para el establecimiento *in vitro* de yemas de campo de guayabo cv. Enana Roja Cubana que permite hasta un 60% de brotación, en los

explantes que logran superar las barreras iniciales de la implantación. A pesar de esto, se requiere buscar, en el cuerpo de la planta de campo, un explante que dada sus características morfo-fisiológicas permita un mejor resultado en esta fase.

4.1.1.3 Contenido de compuestos fenólicos de yemas de diferentes partes del árbol y su relación con el éxito en el establecimiento *in vitro*.

En la tabla 5 se muestra el contenido de compuestos fenólicos totales, ligados a las paredes celulares y solubles en la planta, de yemas de guayabo tomadas de diferentes partes del árbol y colocadas en nitrógeno líquido o en una solución antioxidante de PVPP 250 mg.L⁻¹. El análisis de varianza (ANOVA bifactorial) reveló que existe una significativa influencia de la interacción de ambos factores en el contenido de compuestos fenólicos de los explantes.

La extracción y cuantificación del contenido de compuestos fenólicos en las yemas colocadas en nitrógeno líquido, reflejó de manera puntual, la cantidad de estos compuestos que posee cada tipo de explante *in situ* al momento de la colecta. En cambio, ésta misma cuantificación en los explantes colocados en la solución de PVPP 250 mg.L⁻¹, expresó la cantidad de fenólicos que contienen las yemas al momento en que son utilizadas para su desinfección en el laboratorio, después de transportadas desde el campo. De esta forma se pudo comprobar que independientemente del origen de los brotes, existió una significativa diferencia entre el contenido de compuestos fenólicos de las yemas *in situ* bajo condiciones naturales (nitrógeno líquido) y las yemas que se trasladaron en la solución antioxidante de PVPP 250 mg.L⁻¹ hasta el laboratorio.

Esta diferencia esta dada fundamentalmente por la exudación de los compuestos fenólicos que son absorbidos por el PVPP 250 mg.L⁻¹ durante el traslado del material vegetal. En el caso del nitrógeno líquido no ocurrió la exudación de estos compuestos. Este aspecto es importante, pues se conoce que la mayor cantidad de los compuestos fenólicos se excretan a las soluciones principalmente a partir de los que se encuentran solubles en las vacuolas y de la oxidación de aquellos que se encuentran ligados a las paredes celulares (Kefeli *et al.*, 2003).

El uso del PVPP es señalado con frecuencia en la literatura, especialmente en el guayabo (Jaiswal y Amin, 1987; Amin y Jaiswal, 1987; 1988; Singh *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2006). Sus características como polímero le confieren funciones de adsorción, que son específicas para determinadas moléculas de compuestos orgánicos, como son los fenoles, los cuales son adsorbidos por el PVPP a través de los cuerpos de hidrógenos, lo cual evita la oxidación y la

polimerización de éstos (George, 1993). Para Siddiqui y Farooq (1996) el PVPP 250 mg.L⁻¹ fue el antioxidante de mejores resultados en la reducción de los compuestos fenólicos del guayabo, a diferencia del ácido cítrico y el ácido ascórbico, que resultaron en una respuesta muy pobre.

El análisis de los explantes colocados en nitrógeno líquido (Tabla 5, tratamientos I, II y III), demostró de manera general que los tejidos del guayabo poseen un alto contenido de compuestos fenólicos, lo que concuerda con resultados de León *et al.* (1997) y otros autores que refieren el uso de estas sustancias en la medicina tradicional (Jaiarj *et al.*, 1999; Abdelrahim *et al.*, 2002). El material vegetal que mostró el mayor contenido de fenólicos totales, significativamente superior al resto de los tipos de explantes, fueron las yemas de brotes de la copa del árbol. Le continuaron en orden descendente las yemas de brotes del tronco y las yemas de brotes de la raíz. Estos resultados reflejan que el estado de desarrollo del material vegetal tiene una influencia marcada en el contenido de compuestos fenólicos de los tejidos, ya que los brotes de la raíz (material con características morfológicas más juveniles conforme a su similitud con las plántulas de semillas con pocas semanas de edad) son los que mostraron el contenido significativamente más bajo de fenólicos totales.

Para los compuestos fenólicos ligados a las paredes celulares, se observó que los explantes del tronco y la raíz poseían un contenido significativamente menor que los de la copa del árbol. El hecho de que los primeros a diferencia de estos últimos se encontrasen en crecimiento más activo, para lo cual las paredes celulares requieren de cierta plasticidad (Cosgrove, 2000), puede justificar este resultado. Se conoce que en manzano (*Malus sp.*) la presencia de ácidos hidroxicinámicos, como el ácido ferúlico y otros grupos de compuestos fenólicos juegan un papel importante en el endurecimiento de la pared celular (Treutter, 2001). Otro factor que puede justificar este resultado es la menor incidencia de la luz en los brotes del tronco y la raíz. En eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn) se comprobó que la luz incrementa el contenido de compuestos fenólicos (Arezki *et al.*, 2001). En el guayabo la luz incidió en la morfología de los brotes de plantas jóvenes cultivadas en campo con sombreo artificial y en especial en el contenido de fenoles simples (León *et al.*, 1997).

Para los compuestos fenólicos solubles en la planta, los mayores niveles se observaron en los explantes de la copa y el tronco del árbol, sin diferencias estadísticas entre sí. Para los brotes de la raíz el contenido de compuestos fenólicos solubles fue significativamente inferior. Esta variable indicó mejor las características de juvenilidad de los explantes de brotes de la raíz, pues los distinguió significativamente del resto, en especial de los brotes del tronco, algo que no ocurrió para los compuestos fenólicos ligados a las paredes celulares.

En el caso de los explantes colocados en la solución antioxidante de PVPP 250 mg.L⁻¹ (Tabla 5, tratamientos IV, V y VI), se demostró que el contenido de compuestos fenólicos totales continuó con un comportamiento significativamente superior en los explantes provenientes de la copa del árbol al momento de ser utilizados en el laboratorio. Las yemas de los brotes del tronco y la raíz mostraron los valores más bajos, sin diferencias significativas entre sí. Se observó también que el contenido de compuestos fenólicos ligados a las paredes celulares mostró un comportamiento más uniforme para todos los tipos de explantes. Esto está dado porque la movilización de los compuestos fenólicos a partir de las estructuras rígidas (paredes celulares) tiene un límite que asegura la no desaparición total de éstas (Cosgrove, 2000). Los fenólicos solubles son los que mostraron una mayor variación en dependencia del tipo de explante y por consiguiente con una mayor incidencia en los valores totales.

Numerosos organismos contienen diferentes tipos de compuestos fenólicos y, con importantes excepciones, se desconocen las funciones de la mayoría de éstos, los cuales forman parte del denominado metabolismo secundario (Salisbury y Ross, 1992). La biosíntesis de estos compuestos es afectada por situaciones de estrés, como heridas y ataques de patógenos, que promueven la acumulación de estos compuestos a través de la activación de la enzima fenilalanina-amonio-liasas (en inglés: *PAL*) (Treutter, 2001).

Del mismo modo, se conoce que su acumulación responde a patrones de diferenciación celular que a su vez están sujetos a programas ontogénicos de desarrollo, como ocurrió para los segmentos nodales de semillas de guayabo germinadas *in vitro* (Papadatou *et al.*, 1990). También las condiciones ambientales que modulan el desarrollo, como la luz por ejemplo, influyen significativamente en la acumulación de estas sustancias (León *et al.*, 1997; Arezki *et al.*, 2001). Estos aspectos justifican los resultados obtenidos en los explantes de brotes de la raíz de los árboles de guayabo en cuanto al menor contenido de compuestos fenólicos, pues son éstos, los brotes más juveniles desde el punto de vista ontogénico con respecto al resto de los explantes. Al mismo tiempo, los brotes de la raíz se encuentran situados debajo del follaje del árbol, donde las condiciones de iluminación bajas aseguran una menor acumulación de estos compuestos en los tejidos.

En diversas especies leñosas se obtiene un gradiente de juvenilidad que disminuye a medida que se asciende en el árbol. Así, los brotes que se obtienen más próximos al suelo, con frecuencia tienen características más juveniles, que aquellos que se obtienen en ramas de la copa (Hartmann *et al.*, 1992). De hecho las diferencias que existen entre los órganos juveniles y maduros no solo están asociadas a su morfología y estructura, sino también a sus procesos metabólicos de síntesis y

degradación (Rodríguez *et al.*, 2005a). Ejemplo son los casos del olivo (García *et al.*, 2000) y el castaño (Fernández-Lorenzo *et al.*, 1999) en donde se detectaron compuestos naturales que pueden ser utilizados como marcadores cualitativos de la juvenilidad en el desarrollo de estas especies.

En la tabla 6 se muestra el efecto del origen topofísico del material vegetal (brotes de la copa, del tronco y de la raíz) sobre la respuesta morfogénica de los explantes, durante el establecimiento *in vitro* del segundo lote o grupo de yemas colectadas en solución estéril de PVPP 250 mg.L⁻¹. En este análisis se tuvieron en cuenta el porcentaje de contaminación, fenolización y brotación de los explantes, así como el número de brotes emitidos.

La contaminación no mostró diferencias significativas entre los tres tipos de explantes. Los valores fueron bajos, comparados con la contaminación de los explantes en el experimento 4.1.1.1. Este comportamiento pudo estar relacionado con las diferencias en el tratamiento del material vegetal con relación a la cubierta de nylon polietileno para la etiolación, utilizada solo en el primer experimento. En el porcentaje de fenolización se apreció una marcada influencia del tipo de explante. El mayor valor, significativamente superior al resto, se observó en los explantes de brotes de la copa, seguido en orden descendente por los explantes de rebrotes del tronco y rebrotes de la raíz. Estos resultados demostraron que existe relación entre el contenido de compuestos fenólicos del explante (Tabla 5) y el porcentaje de fenolización que se manifiesta durante el establecimiento *in vitro*. El porcentaje de brotación de las yemas, al igual que el número de brotes por explante, fue significativamente superior en los explantes provenientes de los brotes de la raíz. Las yemas de los brotes de la copa y los brotes del tronco, que fueron capaces de crecer, con el tiempo adquirieron un aspecto endurecido y su nivel de respuesta morfogénica disminuyó.

La superioridad en el establecimiento *in vitro* de los explantes de brotes de la raíz, esta dado fundamentalmente en la potencialidad morfogénica de este tipo de explante por las características juveniles que posee (Figura 3a-e) y que están relacionadas con el menor tamaño del brote, la ausencia de pelos superficiales en el envés de hojas y tallo, la forma de las hojas y la flexibilidad del tallo, que semejan a plántulas de semillas. Esta juvenilidad ontogenética, que se manifiesta en las leñosas, esta relacionada, entre otras cosas, con menores niveles de metilación del ADN genómico (Fraga *et al.*, 2002; Joyce y Cassells, 2002). Este proceso funciona como parte del mecanismo de regulación de la expresión génica en las plantas superiores y justifica los cambios que ocurren en el paso del material juvenil a un estado adulto. Contrario a lo que ocurre cuando el proceso es revertido, o sea del estado adulto al juvenil, como ocurrió para *Pinus radiata*, en la que fue posible alcanzar el

estado juvenil en plantas adultas, utilizando varios métodos para inducir el rejuvenecimiento (Rodríguez *et al.*, 2005a).

La selección del material vegetal con características fisiológicas adecuadas dentro del cuerpo de un árbol maduro puede ser un factor limitado en las plantas leñosas. Por esa razón, son frecuentes los trabajos que estudian explantes con diferentes grados de madurez y lo relacionan con el éxito en el establecimiento *in vitro* (Parra y Amo-Marco, 1998; Fernández-Lorenzo *et al.*, 1999).

En trabajos anteriores en guayabo, se señaló el uso de material juvenil como el de mejor respuesta morfogénica cuando se realizaron comparaciones entre tejidos de plantas adultas, de material parcialmente rejuvenecido y posturas de semillas recién germinadas (Loh y Rao, 1989; Ali *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2006); incluso algunos llegaron a determinar el contenido de fenoles simples para justificar el comportamiento de los brotes de semillas germinadas *in vitro* (Papadatou *et al.*, 1990) o el efecto de la luz en las plantas donadoras (León *et al.*, 1997). Sin embargo, nunca antes se utilizaron los brotes de las raíces de los árboles adultos cultivados directamente en el campo. Esto pudo ser debido, entre otras cosas, a que la formación de este tipo de brotes no es igual de abundante para todos los genotipos y que en la plantación de campo no se permite el desarrollo de este material.

En sentido general, el uso de las yemas de brotes de la raíz, constituye un aporte que distingue a este procedimiento, el cual permitió superar con éxito las barreras biológicas que existían en el establecimiento *in vitro*. Estas barreras provocaron una baja eficiencia y conllevaron al uso de material juvenil de semillas recién germinadas (Pérez *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2006). Por tanto se reconocen las yemas apicales de los brotes de la raíz como los explantes apropiados para iniciar un procedimiento de regeneración de plantas por organogénesis *in vitro* a partir de yemas de campo en el guayabo cv. Enana Roja Cubana.

4.1.2 Multiplicación *in vitro* de los brotes provenientes de yemas de plantas de campo.

4.1.2.1 Efecto de la concentración de BAP.

En la tabla 7 se muestran los resultados del efecto de diferentes concentraciones de BAP en la multiplicación o proliferación *in vitro* de los brotes de guayabo provenientes de las yemas de los brotes de la raíz. El análisis estadístico se realizó al porcentaje de explantes con brotes axilares, al número de brotes por explante y al coeficiente de multiplicación, de cada uno de los tratamientos.

El uso del BAP en el medio de multiplicación estimuló significativamente el porcentaje de explantes con brotes axilares, ya que en ausencia de la citoquinina ($0.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$), ninguno de los explantes

mostró este tipo de brotación, en éstos solo ocurrió el crecimiento del brote principal o explante. Para las concentraciones de 4.4-8.9 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, se observaron los mayores porcentajes de explantes con brotes axilares, sin diferencias significativas entre sí. De igual modo ocurrió para el número de brotes por explante, donde los valores más altos, estadísticamente superiores al resto de los tratamientos, se alcanzaron con concentraciones de 4.4-8.9 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Para la concentración de 2.2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, el número de brotes por explante no mostró diferencias estadísticas con relación al tratamiento sin citoquinina.

Tabla 7. Efecto de la concentración de BAP sobre la multiplicación *in vitro* de los brotes de guayabo provenientes de yemas de brotes de la raíz, a los 45 días de iniciado el cultivo.

BAP ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Explantes con brotes axilares (%)		No. brotes / explante		Coeficiente de Multiplicación	
	^x Media	SR	^y Media	SR	^y Media	SR
0.0	0.00	3.50 c	1.00	30.00 b	0.77	31.03 c
2.2	36.67	10.08 b	1.57	49.48 b	2.90	116.62 a
4.4	76.67	18.58 a	3.07	91.66 a	1.66	70.22 b
6.7	86.67	21.08 a	3.19	96.92 a	1.71	73.35 b
8.9	96.67	24.25 a	3.73	109.27 a	2.10	86.17 b
Significación	*		*		*	
EEx	7.14		0.12		0.09	
CV	0.212		0.653		0.435	

(Para SR con letras desiguales, las medias difieren significativamente según pruebas no-paramétricas de Kruskal-Wallis y Student-Newman-Keuls para $p < 0.05$, SR: suma de rango, EEx: error estándar de la media, CV: coeficiente de variación, ^x cada valor representa el promedio de 6 frascos de cultivo con 7 explantes cada uno, ^y cada valor representa el promedio de 42 explantes).

Este comportamiento de los brotes de guayabo viene dado por la función del BAP, como regulador del crecimiento con carácter citoquinínico, sobre la ruptura de la dominancia apical (Blakesley, 1991). El hecho de que en ausencia de citoquinina, no ocurriese la brotación axilar y sí se observase el crecimiento de la yema apical, hace pensar que los niveles endógenos de citoquininas de los explantes, en el momento de iniciar el experimento, es bajo, aspecto que coincide con la hipótesis planteada por Ali *et al.* (2003) para los brotes de guayabo obtenidos de material de casa de cultivo.

Diversas observaciones soportan la premisa que los reguladores del crecimiento añadidos exógenamente ejercen parte de su efecto mediante modificaciones en las concentraciones hormonales endógenas (Gaspar *et al.*, 1996, 2003). Sobre esta base, se puede asegurar que al aplicar de manera exógena una concentración baja de BAP (en este caso 2.2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), ocurrió un desequilibrio del balance hormonal, con un ligero incremento en los niveles endógenos de citoquininas. De este modo se estimuló el crecimiento del brote principal y también la formación de 1-2 brotes axilares, en más del 35% de los explantes. Por el contrario, cuando las concentraciones exógenas de BAP se incrementaron

por encima del umbral biológico para este genotipo (o sea con concentraciones de 4.4-8.9 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) ocurrió un agudo desequilibrio del balance auxina:citoquinina, lo cual provocó un incremento significativo en los niveles endógenos de citoquininas. De esta forma se produjo la inhibición de la dominancia apical, la disminución en el crecimiento del brote principal y la brotación de las yemas axilares en el 75-95% de los explantes, con un promedio de más de dos brotes axilares.

En cuanto al coeficiente de multiplicación de los brotes, se observó que no mostró correspondencia con el número de brotes por explante. En cambio, se comportó significativamente superior en la concentración de BAP 2.2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, donde el número de brotes fue significativamente inferior. Esto ocurrió debido a que el crecimiento del brote principal fue mayor y permitió dividir estos explantes en varios segmentos de tallos (nodales y apicales). También fue posible, aunque en menor cuantía, la separación de algunos de los brotes axilares formados. Para los explantes cultivados en concentraciones de BAP superiores a 2.2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, el coeficiente de multiplicación se mostró significativamente inferior, debido al menor crecimiento del brote principal, que limitó su división en segmentos de tallo. Además, el tamaño de los brotes axilares formados también fue menor y con frecuencia no fue posible la separación de éstos. El tratamiento sin citoquinina por su parte, mostró el coeficiente de multiplicación más bajo del experimento, lo cual justifica el uso del BAP en la fase de multiplicación de los brotes del guayabo.

En teoría las técnicas de multiplicación por segmentos nodales y por ramificación axilar se explican por separado para lograr una mejor comprensión del proceso (George, 1993). Sin embargo, en la práctica ambas técnicas se utilizan de conjunto. En este experimento, una concentración de BAP 2.2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ favoreció el crecimiento del brote principal y además promovió la formación de brotes axilares. La combinación de ambas técnicas de multiplicación permitió alcanzar el mayor coeficiente de multiplicación.

Las citoquininas se sintetizan en los ápices radicales y viajan a través de los tubos del xilema. En estaquillas o plántulas *in vitro*, la adición de citoquininas exógenas puede, en algunos casos, sustituir a la raíz en la inducción del crecimiento del ápice o en algunas otras respuestas fisiológicas (Salisbury y Ross, 1992). En el caso de los brotes de guayabo, de acuerdo con los resultados de este experimento, todo indica que requieren de una pequeña dosis de citoquinina para suplir la ausencia de las raíces. Además, revelan una alta sensibilidad a las citoquininas (en especial al BAP), aspecto que ha sido expuesto también por otros autores (Amin y Jaiswal, 1987, 1988), quienes refirieron que

la exposición continuada de los brotes a BAP $4.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en el medio de proliferación, provocó la supresión del crecimiento del brote y en ocasiones la necrosis del ápice.

Por otro lado, el resultado de este experimento no coincide con los trabajos que hacen uso del BAP para promover la multiplicación o proliferación de los brotes de guayabo provenientes de material adulto, donde los mejores resultados se alcanzaron con una concentración de $4.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Jaiswal y Amin, 1987; Amin y Jaiswal, 1987, 1988; Loh y Rao, 1989; Singh *et al.*, 2001). Esta divergencia puede estar causada por la juvenilidad ontogenética que caracteriza a los brotes de la raíz de las plantas de campo, los cuales, a diferencia de los explantes de la copa (utilizados en esos trabajos), requieren menores concentraciones de BAP y se asemejan más en su comportamiento *in vitro* al material obtenido a partir de semillas (Pérez *et al.*, 2002; Ali *et al.*, 2003). Otros investigadores utilizaron con éxito, combinaciones de BAP $4.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ y auxinas (ANA o AIA, $0.1-0.5 \text{ mg.L}^{-1}$), en especial para la forma silvestre de guayabo ‘Cotorrera’ (Rodríguez *et al.*, 2006). El uso de otras citoquininas, como el TDZ ($0.9 - 9.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$) produjeron brotes atrofiados, achaparrados y amarillentos (Mohamed-Yasseen *et al.*, 1995; Pérez *et al.*, 2002).

El uso de altas concentraciones de BAP ($8.9 \mu\text{mol.L}^{-1}$) en el material de semillas, se ha utilizado para promover la mayor proliferación en los brotes de guayabo haciendo una marcada incidencia en el uso de brotaciones axilares múltiples, con tiempos de cultivo de hasta 16 semanas (Papadatou *et al.*, 1990). Sin embargo, se ha comprobado por otros autores que el uso de éstas altas concentraciones va en detrimento de la calidad de los brotes (Loh y Rao, 1989) y afecta la eficiencia del enraizamiento *in vitro* (Ali *et al.*, 2003). Por esa razón en este estudio se prefirió trabajar con concentraciones bajas.

Con este resultado se logra la multiplicación *in vitro*, mediante la combinación de las técnicas de segmentos nodales y ramificación axilar, que permite incrementar el número de explantes en cultivo para el guayabo cv. Enana Roja Cubana. Además, se sugiere el uso del BAP a la concentración de $2.2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, como la apropiada para lograr el mayor coeficiente de multiplicación.

4.1.2.2 Efecto del número de subcultivos.

En la figura 4 se observa el efecto del número de subcultivos sobre el coeficiente de multiplicación de los brotes de guayabo cultivados en el medio de multiplicación o proliferación *in vitro*, definido en el experimento anterior para el material de brotes de raíz de plantas de campo. El análisis se realizó hasta el noveno subcultivo.

De manera general, se puede observar que existió una primera etapa, que abarcó los dos primeros subcultivos, donde el coeficiente de multiplicación fue significativamente bajo con valores entre 2.5-2.9 segmentos de tallo (explantes) por brote. A partir del tercer subcultivo se obtuvo un incremento en el coeficiente que alcanzó hasta 3.8 explantes por brote en el cuarto subcultivo. Desde este último y hasta el octavo subcultivo se muestra una nueva etapa donde el coeficiente de multiplicación se estabilizó con un valor promedio de 4.0 explantes por brote. Al finalizar esta etapa, en el noveno subcultivo, se observó una disminución significativa del coeficiente de multiplicación. Este hecho pudiera significar el comienzo de una nueva etapa donde ocurre una declinación en el crecimiento y la proliferación de los brotes en cultivo.

Se conoce que el número de subcultivos de los explantes es un factor de mucha importancia en la propagación *in vitro*. En primer lugar porque se considera un elemento que provoca cambios en el material vegetal, los cuales pueden implicar o no variabilidad genética (Péros *et al.*, 1998; Olmos *et al.*, 2002). Al respecto, en el guayabo no se tienen precedentes, ya que los trabajos realizados a partir de plantas adultas no refieren criterios sobre la estabilidad genética del material vegetal producido por cultivo *in vitro* (Jaiswal y Amin, 1987; Amin y Jaiswal, 1987, 1988; Loh y Rao, 1989; Singh *et al.*, 2001).

La segunda razón está relacionada con la acumulación endógena de reguladores del crecimiento (en especial citoquininas) en el tejido vegetal cultivado *in vitro*, factor que va en aumento a medida que se realizan los subcultivos (Blakesley, 1991). Esta acumulación puede estar dada por la pobre metabolización que tienen los reguladores del crecimiento citoquinínicos en las células vegetales (Perrin *et al.*, 1998) o por la inducción que éstos pueden provocar para la síntesis/acumulación de Zeatina u otra citoquinina endógena (Caboni *et al.*, 2002).

De una u otra forma la acumulación de estas sustancias en el tejido es importante para alcanzar determinados niveles de respuestas como la brotación de yemas axilares latentes, la formación de un callo, o la diferenciación de un brote caulinar, etc. Sin embargo, la acumulación excesiva de éstas sustancias, pudiera en algunos casos, llegar a ser tóxico para el tejido (Blakesley, 1991). En algunos casos se plantea que los explantes muestran un alto potencial regenerativo al inicio del cultivo, el cual va declinando a través de los subcultivos, provocado por toxicidad a causa de un exceso de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo o por la exposición durante largos períodos de tiempo a estos reguladores (Litz y Jaiswal, 1991). Sin embargo, otros como Sha Valli

Khan *et al.* (1999) aseguran que en el *Zyzygium alternifolium* (Myrtaceae) el coeficiente de multiplicación se incrementó con el aumento del número de subcultivos y que se mantuvo estable por más de dos años.

En el guayabo, por el contrario, Amin y Jaiswal (1987, 1988) señalaron que la exposición continuada de los brotes en BAP $4.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en el medio de proliferación, provocó la supresión del crecimiento del brote y la necrosis del ápice. Estos mismos autores refirieron que el número de subcultivos incrementó la tasa de proliferación, pero que después del sexto subcultivo en el medio de multiplicación, el valor de ésta declinó porque los brotes se hicieron muy achaparrados. El coeficiente de multiplicación mostrado por los explantes del guayabo cv. Enana Roja Cubana en este experimento, se comportó de manera similar, excepto que en este caso el primer indicio de declinación del coeficiente se observó en el noveno subcultivo. Esta diferencia puede estar dada en el uso de una concentración menor de BAP, lo cual prolongó el período de acumulación de las citoquininas endógenas. Además pudiera estar influenciado por el uso de material proveniente de brotes de la raíz de plantas de campo que es un material muy juvenil, pues para Papadatou *et al.* (1990) el uso de mayores concentraciones de BAP ($8.9 \mu\text{mol.L}^{-1}$) y largos tiempos de cultivo (16 semanas) en el material de guayaba proveniente de semillas germinadas *in vitro* no afectó la tasa de proliferación ni causó el necrosamiento de los ápices. Todo lo cual se justificó debido al uso de material juvenil.

De manera general en el guayabo los trabajos anteriores brindan muy poca información sobre el número de subcultivo y sus efectos en el coeficiente de multiplicación. En otras especies, como el *P. salutare* (HBK) Berg., se proporciona mayor información (Sotolongo, 2000). En este caso con la adición de BAP 1.0 mg.L^{-1} y AIA 1.5 mg.L^{-1} se logró una elevada tasa de multiplicación (4.6 brotes/explante) y el mejor desarrollo de los brotes, durante un período de 12 meses. En el guayabo cv. Enana Roja Cubana, en este estudio, se alcanzó un coeficiente de multiplicación similar, en el mismo período de tiempo, pero, con una menor concentración de BAP y sin la adición de otro regulador del crecimiento.

A partir de los resultados de este experimento se concluye que en la fase de multiplicación *in vitro* del guayabo cv. Enana Roja Cubana, se logra alcanzar una tasa de multiplicación estable de 3.8-4.3 segmentos de tallo por brote, cada 45 días, la cual se alcanza en el quinto subcultivo y comienza a declinar a partir del noveno.

4.1.3 Enraizamiento *in vitro* de los brotes de guayabo.

4.1.3.1 Efecto de reguladores del crecimiento de carácter auxínico.

En la tabla 8 se muestran los resultados del efecto de diferentes tratamientos auxínicos utilizados para inducir el enraizamiento y el crecimiento *in vitro* de los brotes de guayabo provenientes de la multiplicación. En sentido general se observó un alto porcentaje de enraizamiento en los cuatro tratamientos estudiados. El mayor valor, donde enraizó el ciento por ciento de los brotes, se alcanzó en el tratamiento donde se combinaron ambas auxinas. Sin embargo, este valor solo mostró diferencias estadísticas con el tratamiento donde se utilizó el ANA de manera individual. En el medio de cultivo sin reguladores del crecimiento, también se alcanzó un porcentaje de enraizamiento significativamente superior a este tratamiento.

Tabla 8. Efecto de diferentes tratamientos de medio de cultivo con reguladores del crecimiento de carácter auxínico sobre los brotes de guayabo, a los 45 d de iniciado el cultivo.

Tratamientos con auxinas ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	^x Enraizamiento (%)	^y No. raíces/brote	^y Longitud raíz (cm)	^y No. nudos/brote	^y Longitud brote (cm)
MS + AIB (0.98)	91.84 ab	2.31 b	1.53 c	2.92 b	2.13 c
MS + ANA (1.07)	85.71 b	2.33 b	1.37 c	2.65 b	2.27 c
MS + AIB (0.98) + ANA (1.07)	100.0 a	3.16 a	2.40 a	3.37 a	2.58 b
MS (sin auxinas)	97.96 a	2.10 b	1.78 b	4.02 a	2.99 a
Significación	*	*	*	*	*
EEx	1.71	0.09	0.08	0.12	0.07
CV	0.097	0.193	0.236	0.194	0.144

(Medias con letras desiguales difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA de un factor y DHS de Tukey, para $p < 0.05$, EEx: error estándar de la media, CV: coeficiente de variación, ^x cada valor representa el promedio de 7 frascos de cultivo con 7 explantes cada uno, ^y cada valor representa el promedio de 49 explantes).

Cuando se analizan las restantes variables se evidencia una superioridad en los tratamientos donde se combinaron ambos reguladores del crecimiento. En cuanto al número de raíces emitidas por explante y a la longitud de la raíz mayor, el uso de la combinación de auxinas arrojó los mayores valores, los cuales superaron significativamente del resto de los tratamientos. En el análisis del número de nudos por brote se observó como los mejores resultados, sin diferencias estadísticas entre sí, se alcanzaron con los tratamientos sin auxinas y de combinación de AIB + ANA. Para la longitud de los brotes, el mejor resultado se obtuvo con el medio de cultivo sin auxinas, el cual fue significativamente superior al resto. En los tratamientos donde se utilizaron los reguladores del crecimiento de manera individual los resultados fueron menos favorables.

El uso de estos reguladores del crecimiento en concentraciones similares está señalado en la literatura, especialmente para el enraizamiento *in vitro* de brotes de guayabo (Jaiswal y Amin, 1987;

Amin y Jaiswal, 1987; 1988). Estos autores lograron el enraizamiento con el empleo de AIB y ANA a una concentración de 0.2 mg.L^{-1} para ambos reguladores del crecimiento ($0.98 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ y $1.07 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente) y obtuvieron un enraizamiento máximo del 80.0% en los cultivares ‘Chitidar’ y ‘Banaras Local’.

En la guayabita del pinar (*P. salutare* (HBK) Berg.) se utilizaron diferentes concentraciones y combinaciones de auxinas para el enraizamiento *in vitro*. Los mejores resultados (90%) se alcanzaron con la combinación de AIB $0.98 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ y ANA $1.07 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, en ambos casos. También se utilizó 1 g.L^{-1} de carbón activado como suplemento al medio de cultivo de enraizamiento (Sotolongo, 2000). De igual forma, en el enraizamiento *in vitro* de los brotes micropropagados del guayabo ‘Cotorrera’, la adición de AIB $0.98 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ y ANA $1.07 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, produjo los mejores resultados con porcentajes de enraizamiento que oscilaron entre 60-80% (Rodríguez *et al.*, 2006). Mientras, en brotes de guayabo ‘Enana Roja Cubana’, obtenidos a partir de semillas germinadas *in vitro*, el medio MS sin reguladores del crecimiento produjo un enraizamiento *in vitro* satisfactorio (Pérez, 2000).

En el presente estudio, con la combinación de ambos reguladores del crecimiento (AIB y ANA), se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a la calidad del enraizamiento. Esto demuestra que la combinación de ambas auxinas proporcionó el balance hormonal más apropiado para el desarrollo de las raíces adventicias en los brotes de guayabo.

Con relación a la calidad de los brotes los resultados fueron intermedios. Contrario ocurre con el uso del medio de cultivo sin reguladores del crecimiento, donde se lograron los mejores resultados con respecto a la calidad de los brotes, mientras que para la calidad de las raíces el resultado fue intermedio (o sea estadísticamente inferior al tratamiento de combinación de auxinas).

El origen de los explantes, el tipo y concentración de reguladores del crecimiento durante las fases de inducción y proliferación de los brotes, así como la edad del cultivo, influyen significativamente en los requerimientos de auxinas para lograr el enraizamiento *in vitro* en el guayabo (Amin y Jaiswal, 1987, 1988; Mohamed-Yasseen *et al.*, 1995; Ali *et al.*, 2003) y en otras especies leñosas (List *et al.*, 1996; Cantagallo *et al.*, 2005). Este aspecto justifica los altos porcentajes de enraizamiento (85-100%) que se alcanzaron en este experimento en los diferentes tratamientos. Los explantes utilizados tuvieron un origen a partir de brotes con características muy juveniles (brotes de la raíz de la planta) y se multiplicaron en un medio de cultivo con bajas concentraciones de BAP ($2.2 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$). Sin embargo, para justificar el nivel de enraizamiento en el tratamiento sin reguladores del crecimiento,

otros factores deben ser considerados. El elemento más importante en este caso es el balance hormonal endógeno de los brotes de guayabo favorable a las auxinas (Ali *et al.*, 2003).

La auxina natural AIA se sintetiza en las hojas jóvenes y ápices en crecimiento, y se transporta basípetamente a través del tallo mediante difusión polar quimiosmótica (transporte polar de auxinas) en tejidos asociados con el sistema vascular, en especial el floema (Marks *et al.*, 2002). De esta forma los ápices de los brotes de guayaba son capaces de producir suficientes cantidades de AIA que permiten inducir el desarrollo de las raíces adventicias en un medio libre de reguladores del crecimiento (Tabla 8). Un comportamiento similar se observó para el cultivar de guayabo ‘Chitidar’, (Amin y Jaiswal, 1988) en donde enraizó el 72% de los brotes cultivados en el tratamiento sin auxina.

El tratamiento sin reguladores del crecimiento se considera la mejor variante, debido a que además de implicar un ahorro de materiales en el medio de cultivo, garantiza un nivel de enraizamiento alto y una mejor calidad de los brotes. Al mismo tiempo, es importante señalar que los indicadores de calidad del brote (longitud y número de nudos) se consideran variables importantes en la definición del medio de cultivo de enraizamiento, siempre y cuando el porcentaje de brotes con raíces no sean significativamente bajos.

4.1.3.2 Estudio histológico del proceso de enraizamiento.

Un aspecto de considerable importancia durante la fase de enraizamiento está relacionado con el origen y la calidad de las raíces adventicias producidas *in vitro*. Esta calidad pudiera estar asociada a una apropiada continuidad vascular entre el tallo y las raíces emitidas. Para comprobar las características de las raíces adventicias regeneradas *in vitro* en los brotes de guayabo cv. Enana Roja Cubana, se realizó un estudio histológico, sobre el cual se muestran los principales resultados resumidos en las imágenes de la figura 5a-d.

En general se observó que la región basal del tallo del brote, que se utiliza para el enraizamiento *in vitro*, presenta un desarrollo vascular abundante, tanto a nivel del entrenudo (Figura 5a), como a nivel del nudo (Figura 5b). Este tejido vascular se caracterizó por un crecimiento secundario con abundante xilema y floema, así como la presencia de un cambium vascular bien definido. Es oportuno señalar que con frecuencia se observaron características de juvenilidad, como la simetría rectangular del tallo y la presencia de aleros laterales, típico del *P. guajava* en condiciones naturales. Este aspecto demostró que el alto porcentaje de enraizamiento que se alcanzó con este material estuvo vinculado a su grado de juvenilidad, independientemente de la presencia o no de reguladores del crecimiento.

En las muestras tomadas a los 7 d de iniciado el cultivo (Figura 5c) se muestra como el desarrollo de la raíz *in vitro* se inició con una deformación del cilindro central del tallo, asociado a la formación de meristemas a partir de células del cambium vascular o periciclo. De esta manera no se originaron tejidos parenquimáticos intermedios entre el sistema vascular del tallo y las nuevas raíces en formación que se observaron en las muestras colectadas y procesadas a los 15 d de cultivo (Figura 5d). El crecimiento de la raíz continuó y al mismo tiempo se incrementó un proceso de hiperplasia en la base del tallo que trajo consigo una deformación completa de este órgano hasta perder sus características morfológicas iniciales descritas en la figura 5a. No obstante, el desarrollo vascular continuo entre la raíz y el tallo se mantuvo. Todo esto indica que el enraizamiento que ocurrió en los brotes de guayabo, en este experimento, responde a un sistema radicular adventicio inducido bajo un nivel hormonal adecuado. Cuando los niveles son inapropiados, las raíces de los brotes *in vitro* no tienen unión vascular con el tallo, éstas son numerosas, superficiales y con frecuencia se forma un callo en la base del explante (De Klerk *et al.*, 1999).

En el guayabo a pesar de los diferentes estudios relacionados con la multiplicación *in vitro* de los brotes que se han realizado (Jaiswal y Amin, 1987; Amin y Jaiswal, 1987; 1988; Mohamed-Yasseen *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2002; Ali *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2006), nunca antes se hicieron estudios histológicos en ninguna de las fases del proceso. Sobre el enraizamiento las experiencias anteriores solo refieren el uso o no de reguladores del crecimiento, el momento en que las raíces comienzan a ser visibles y la cantidad y longitud de éstas.

Con este experimento, es la primera vez que se realiza un estudio sobre la confirmación histológica de la calidad del enraizamiento *in vitro* de los brotes en el *P. guajava*, lo cual también es poco frecuente en especies leñosas. Como resultado de este estudio se logró demostrar que el enraizamiento *in vitro* en los brotes de guayabo es apropiado y que las raíces poseen continuidad vascular con el tallo.

4.1.4 Aclimatización *ex vitro* de los brotes enraizados

Durante la aclimatización *ex vitro* de los brotes enraizados, se observó una marchites inicial de las vitroplantas en las primeras 72 horas de cultivo en zeolita 100% (v/v) con riego por microaspersión de 10 s cada 5 min, bajo cobertor de nylon. Posteriormente ocurrió una recuperación de las vitroplantas, las cuales recobraron el estatus hídrico que poseían al momento de ser plantadas. De esta forma se logró alcanzar un porcentaje de supervivencia del 94.7% después de 30 d de aclimatización.

Sobre el comportamiento *ex vitro* de las vitroplantas de guayabo existe poca información. A pesar de esto, los resultados obtenidos en cuanto a la supervivencia de las vitroplantas, coinciden con los rangos señalados en trabajos anteriores para otros cultivares de guayabo (Jaiswal y Amin, 1987; Amin y Jaiswal, 1987; 1988; Papadatou *et al.*, 1990; Mohamed-Yasseen *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 2006), en los cuales la aclimatización no se explica como una fase recalcitrante dentro del proceso.

El comportamiento de marchites acentuada durante los primeros días de la aclimatización seguidos de una recuperación favorable del estatus hídrico de las vitroplantas de guayabo, debió ser causado por la continuidad vascular que existe entre las raíces y el tallo, aspecto comprobado en el epígrafe anterior. Esta comunicación funcional entre las raíces formadas *in vitro* y el tallo, pudo permitir una mayor participación de éstos órganos en los mecanismos de absorción de agua durante los primeros días de plantadas. Un aspecto que puede garantizar este hecho es que, al momento del transplante para la fase de vivero (30 d), se comprobó que no existió formación de nuevas raíces a partir de los tallos de los brotes de guayabo. El número de raíces seguía siendo el mismo que al inicio del proceso de aclimatización (datos no mostrados).

A los 7 d se modificaron las condiciones de cultivo con una reducción de la frecuencia de riego a 27 s cada 30 min, hasta los 30 d de aclimatización. En este período las vitroplantas crecieron y mostraron signos de un buen estado nutricional y fitosanitario (Figura 6a). Esto permitió que se transplantasen, con un alto porcentaje de éxito, a bolsas de polietileno (Figura 6b) que contenían una mezcla de suelo y cachaza 1:1 (v/v).



Figura 6. Vitroplantas de guayabo en fase de aclimatización. a) A los 30 días de cultivo en sustrato de Zeolita 100% (v/v) y b) Dos semanas después de transplantadas a bolsas de nylon polietileno.

Las vitroplantas de guayabo en este estudio no mostraron un comportamiento recalcitrante en la fase de aclimatización, siempre y cuando se garantizaron condiciones de alta humedad ambiental y una buena porosidad del sustrato. Al respecto, las experiencias en Cuba son favorables. Tal es el caso de la aclimatización de vitroplantas enraizadas de guayabita del pinar (*P. salutare* (HBK) Berg.) donde se logró una supervivencia del 75%, utilizando como sustratos mezclas de suelo y humus de lombriz, con protección de polietileno transparente y riego con microaspersores cada dos horas durante el período diurno (Sotolongo, 2000).

En la forma silvestre de *P. guajava* 'Cotorrera', Rodríguez *et al.* (2006), alcanzaron porcentajes de supervivencia superiores al 80%, utilizando una mezcla estéril de suelo y cachaza (1:1), con dos riegos semanales y una cubierta de nylon durante 10 d, la cual se fue retirando paulatinamente. También, en el cultivar Enana Roja Cubana con una metodología de aclimatización similar a la utilizada en este trabajo, pero en vitroplantas obtenidas a partir de semillas germinadas *in vitro*, se alcanzó una supervivencia del 97.65% (Pérez, 2000).

4.1.5 Estudio agro-morfológico en campo de plantas de guayabo obtenidas *in vitro* y plantas provenientes de estacas enraizadas.

Comparación fenológica de los árboles. En la tabla 9 se muestra el resultado de la comparación entre las plantas de guayabo cv. Enana Roja Cubana procedentes del cultivo *in vitro* (vitroplanta) y del enraizamiento de esquejes (estaca), en función de las principales variables fenológicas estudiadas. En ella se resume la información en dos momentos principales, al inicio del estudio, en mayo del 2005, y al final, en marzo del 2006.

Con respecto a las primeras cuatro variables, relacionadas con el tamaño del árbol, se observaron resultados diferentes de acuerdo al tipo de planta en cada momento de la evaluación, excepto para la variable de altura de la planta. En ésta no se mostraron diferencias significativas entre las vitroplantas y las estacas tanto en la evaluación inicial como en la final. Lo cual explica un crecimiento parejo para ambos grupos de plantas. Con relación al diámetro de la copa y del tronco, las vitroplantas fueron significativamente inferiores en la evaluación inicial. Esto pudo deberse a las características propias de la estaca como propágulo, en la cual, el segmento de tallo utilizado para enraizar tiene un grosor superior a las vitroplantas cuando son transplantadas a bolsas después de la aclimatización. De igual forma ocurrió con el diámetro de la copa donde las estacas se caracterizaron por un crecimiento más ramificado y por tanto esta variable fue significativamente superior durante la evaluación inicial. Estas diferencias en las variables de crecimiento, desaparecieron en la

evaluación final, lo que reveló un carácter epigenético en estas variaciones. Un análisis del comportamiento de estas variables en el tiempo (Anexo IIIa), reflejó el desarrollo de curvas similares para ambos tipos de plantas.

La altura de las plantas de ambos grupos, al final de la evaluación, está por debajo de la señalada en la literatura para el cultivar Enana Roja Cubana (Peña *et al.*, 1996). El factor que determina esta diferencia es la edad del cultivo, pues en este experimento en el momento de la evaluación final, los árboles solo tenían un año y cinco meses de edad.

En cuanto a las variables número de botones, flores y frutos por planta (Tabla 9) se apreció un resultado similar para ambos grupos de plantas en la evaluación inicial, los cuales durante esta etapa de la plantación no son relevantes. Sin embargo, en la evaluación final, el número de botones y el número de frutos por planta, se incrementaron significativamente en los árboles provenientes de estacas enraizadas. En relación con el número de flores por planta en la evaluación final, los resultados fueron estadísticamente similares para ambos grupos de plantas. Las características de la biología floral del guayabo, con un breve tiempo de duración de la flor abierta (Caraballo, 2001), explican este resultado.

Al evaluar la cantidad promedio de plantas con botones, flores y frutos, los resultados fueron diferentes (Tabla 9). En este caso la precocidad característica del cultivar Enana Roja Cubana (Peña *et al.*, 1996), se puso de manifiesto con mayor intensidad en las plantas provenientes de estacas. En las vitroplantas, en la evaluación inicial se observó que el número de plantas que habían alcanzado el estado reproductivo era significativamente menor que en las plantas de estaca. En la evaluación final esa superioridad solo se mantuvo con relación a la variable cantidad de plantas con frutos.

El comportamiento de estas variables en el tiempo (Anexo IIIb) demuestra que los porcentajes de plantas con botones, flores y frutos fueron muy variables en ambos grupos de plantas, sin embargo los valores siempre fueron superiores en las plantas provenientes de estacas enraizadas. En sentido general se puede resumir que las variables fenológicas de carácter reproductivo se comportaron más inestables que las variables de crecimiento. Este comportamiento está más asociado con la frecuencia semanal de evaluación, que con la variación que puede introducir el método de propagación en sí.

Si se tiene en cuenta que la emisión de órganos reproductivos es el principal indicador del cambio fisiológico de un estado joven a un estado adulto en los árboles (Rodríguez *et al.*, 2005a), se puede decir que las vitroplantas de guayabo mostraron un menor grado de madurez en comparación con las

plantas de estaca. Este comportamiento es frecuente en las plantas que son producidas mediante el cultivo de tejidos *in vitro* (López, 2006; Mederos, 2006). La causa fundamental de este tipo de respuesta en el material *in vitro* está relacionada con el rejuvenecimiento que produce esta técnica, como parte de un grupo de variaciones de carácter epigenético que no son estables y se producen debido a cambios en los patrones de metilación del ADN y de amplificaciones génicas, provocadas por las condiciones microambientales del cultivo de tejidos (Kaepler *et al.*, 2000). Un elemento importante que pudiera significar la recuperación de las características productivas de la Enana Roja Cubana, en el material producido *in vitro*, pudiera ser el incremento en el número de botones por planta que experimentó este grupo en la evaluación final, el cual se igualó estadísticamente con las estacas (Tabla 9).

De acuerdo con Peña *et al.* (1996) y Martínez (1998), bajo las condiciones de Cuba existen dos picos florales. El primero y de mayor intensidad, se origina en los meses de Marzo-Abril y los frutos son cosechados en mayor volumen en los meses de Agosto-Septiembre; estos frutos son de menor calidad y dulzor. El segundo es de menor intensidad, se origina al inicio del invierno, en los meses de Octubre-Noviembre y los frutos son cosechados en mayor volumen en los meses de Marzo-Abril y son de mayor calidad y dulzor. En este estudio el pico de cosecha aprovechable fue el segundo, el cual que se caracterizó por ser de un bajo rendimiento para ambos tipos de plantas (Tabla 9). No obstante, las estacas superaron significativamente a las vitroplantas.

Según Araujo (1999), en la Florida árboles de guayabo de 2 años de edad produjeron alrededor de 14 Kg de frutas, y llegaron a producir a los 4 años de edad hasta 225 Kg de frutos/año. En el presente estudio los resultados son bajos si se tiene en cuenta que los árboles tienen un año y cinco meses de edad. Sobre estos resultados de rendimiento influyeron las condiciones climáticas ocurridas, en especial un periodo de precipitaciones muy escasas (Anexo II).

En el guayabo, el agua juega un papel importante en todas las respuestas positivas de la planta y en especial en el rendimiento (Chirinos-Torres *et al.*, 2006). De acuerdo con Laguado *et al.* (1999a) en la etapa de crecimiento del fruto, se requiere de grandes cantidades de materias alimenticias que deben ser trasladadas desde otras partes de la planta, fundamentalmente de las hojas y los tallos, y el agua constituye el solvente natural de las plantas para el movimiento de todos los solutos en ellas (Salisbury y Ross, 1992). De ahí las afectaciones registradas en el rendimiento e incluso en el crecimiento de los árboles (aspecto señalado anteriormente).

Comparación bromatológica de los frutos. En la tabla 10 se exponen las principales características bromatológicas físico-cualitativas observadas en los frutos durante el estudio comparativo entre las vitroplantas y las estacas. Para exponer los resultados de las variables evaluadas se utilizó un análisis de frecuencia de las características observadas en cada grupo de planta.

De manera general se observa que los frutos de las plantas propagadas por cultivo *in vitro* y las plantas provenientes de estacas enraizadas poseen características cualitativas similares, las cuales además coinciden con las citadas por Peña *et al.* (1996) para el cultivar de guayabo Enana Roja Cubana. El porcentaje de variación observado fue relativamente bajo en ambos tipos de plantas, si se compara con los métodos de propagación por semilla en donde se asegura que se alcanza hasta un 30% de variabilidad (Pontikis, 1996).

Estas variables se consideran de gran importancia, pues le atribuyen a la fruta un valor comercial atractivo (Laura y Arango, 2001). De igual forma, el color de la pulpa del fruto tiene importancia desde el punto de vista industrial y comercial (González *et al.*, 1985; Laura y Arango, 2001). Al respecto en este estudio, se observó una alta estabilidad de las plantas provenientes del cultivo *in vitro* con relación al color rosado de la pulpa. Las principales variaciones se observaron en características como la forma del extremo peduncular del fruto, que es con frecuencia una de las más variables para este genotipo (Rodríguez *et al.*, 2005c).

Los caracteres físico-cuantitativos de la evaluación bromatológica de los frutos (Tabla 11) muestran también que existe similitud entre los frutos cosechados de uno y otro grupo de plantas. Con excepción del diámetro de la base de la corola, el cual fue significativamente superior en las vitroplantas, en el resto de las variables no se mostraron diferencias estadísticas relevantes. Esa superioridad del diámetro de la base de la corola en las vitroplantas con respecto a las plantas de estaca, puede estar asociada al ligero mayor tamaño, aunque no significativo, de los frutos de las primeras.

Entre los indicadores más valorados por los consumidores en Cuba se encuentran aquellos relacionados con el tamaño de la fruta (Pages, 2004). Las frutas cosechadas en este estudio se clasificaron como frutos de mediano a grandes, lo cual coincide con lo señalado por Peña *et al.* (1996), en la descripción del cultivar Enana Roja Cubana. En general todas las variables evaluadas mantuvieron valores que se encuentran dentro de los rangos señalados por otros autores (González *et al.*, 1985; Laguado *et al.*, 1999b; Morales y Rodríguez, 2000; Collado *et al.*, 2002), e incluso por los datos recogidos en el Instructivo Técnico desarrollado por el Ministerio de la Agricultura para el cultivo del guayabo cv. Enana Roja Cubana (MINAG, 2004).

Con respecto a las principales características químicas de los frutos cosechados (Tabla 12) se pudo comprobar un comportamiento similar a los casos anteriores. En ninguna de las variables utilizadas para la comparación entre las plantas procedentes del cultivo *in vitro* y del enraizamiento de esquejes, se observaron diferencias estadísticas significativas. Esto sugirió que el método de propagación por cultivo *in vitro* no produce variaciones substanciales en los indicadores químicos, los cuales constituyen elementos importantes de la calidad del fruto y de un alto valor dietético (Araujo *et al.*, 1997).

Tabla 12. Principales características químicas de los frutos cosechados en el estudio bromatológico comparativo entre plantas de guayabo procedentes del cultivo *in vitro* (vitroplanta) y del enraizamiento de esquejes (estaca).

Variables (UM)	Tipo de planta		Sig.	EEx	CV
	Vitroplanta	Estaca			
Semisólidos Solubles Totales (°Brix)	8.69	9.20	ns	0.226	0.152
pH	4.26	4.34	ns	0.031	0.043
Acidez (%)	0.17	0.16	ns	0.005	0.178
Vitamina C (mg/100g de pulpa)	381.71	444.12	ns	16.484	0.240

(Para cada variable, medias con letras desiguales difieren estadísticamente según prueba paramétrica de *t*-Student, para $p < 0.05$. UM: unidad de medida, ns: no significativo, EEx: error estándar de la media, CV: coeficiente de variación, cada valor representa el promedio de 144 frutos, a razón de 24 frutos por repetición).

Con excepción de la acidez titulable, los resultados obtenidos en las restantes variables evaluadas, se mantuvieron dentro de los rangos señalados para el cultivar Enana Roja Cubana, en diversos estudios relacionados con la composición química de los frutos de guayabo (González *et al.*, 1985; Laguado *et al.*, 1999b; Morales y Rodríguez, 2000). De acuerdo con Rodríguez *et al.* (2005c), durante la caracterización morfo-agronómica y molecular del banco nacional de germoplasma de guayabo, la acidez titulable, el contenido de vitamina C y el número de semillas por frutos se mostraron particularmente variables en comparación con los coeficientes de variación experimentados por los restantes descriptores.

Para las condiciones de Cuba se realizó un estudio con 10 cultivares de guayabo con vistas al mejoramiento (González *et al.*, 1985). En éste se informó un registro promedio de acidez titulable de 0.37% para el cultivar Enana Roja Cubana. Los valores de la acidez titulable en este trabajo están por debajo de los señalados en la literatura, puede estar asociado a las condiciones de sequía bajo las cuales se desarrollaron los frutos (Anexo I).

Según Saltos *et al.* (2003), conforme aumenta el contenido de sólidos solubles disminuye el porcentaje de acidez, siendo este comportamiento el responsable de proporcionar al guayabo el sabor

característico. El aumento en sólidos solubles es fundamentalmente debido al incremento en el contenido en azúcares como la sacarosa, resultado de la maduración de los frutos (Laguado *et al.*, 1998). La cosecha evaluada en este estudio se correspondió, con el período floral de Octubre-Noviembre, donde se obtienen los frutos de mayor dulzor en el período Marzo-Abril (Peña *et al.*, 1996). Este período, transcurrió con precipitaciones muy escasas, baja humedad relativa y bajas temperaturas (Anexo I), lo que pudo promover una alta tasa de conversión de azúcares. La disminución de la acidez titulable afectó de igual forma a las vitroplantas y a las estacas, esto corrobora el planteamiento anterior y descarta un efecto negativo que pudiera producir la aplicación del método de regeneración *in vitro*.

De manera general se recomienda realizar estudios de estabilidad genética con el uso de marcadores moleculares (Rodríguez *et al.*, 2005c), para complementar los resultados de estabilidad fenotípica obtenidos en este trabajo.

Con este último experimento quedó concluido el ciclo general del protocolo de regeneración de plantas por organogénesis a partir de yemas de árboles de campo en el guayabo cv. Enana Roja Cubana (Figura 7), el cual podrá ser utilizado en aplicaciones como la propagación, el mejoramiento genético y la conservación e intercambio de germoplasma en esta especie. El mismo quedó constituido por siete fases principales: Plantas madres, Establecimiento, Multiplicación, Enraizamiento, Aclimatización, Vivero y Plantación en campo. En sentido general, el procedimiento dedicó un importante esfuerzo a la fase inicial de colecta y establecimiento de los explantes, por ser ésta, la más recalcitrante. Seguidamente, las fases restantes, permitió dar continuidad al proceso hasta alcanzar las etapas de vivero y plantación en campo.

Como consideraciones finales del estudio, se puede decir que el objetivo específico planteado al inicio del mismo se alcanzó, pues se logró establecer un procedimiento de organogénesis *in vitro* a partir de yemas de árboles de campo. Este procedimiento se destacó por el uso de yemas juveniles de brotes de la raíz como material de partida, el uso combinado de las técnicas de multiplicación a través de segmentos nodales y de ramificación axilar, así como por una adecuada continuidad vascular entre el tallo del brote y las raíces adventicias surgidas *in vitro*, y una favorable estabilidad fenotípica de las vitroplantas producidas, en especial con relación al crecimiento de la planta y la calidad de los frutos.

En cuanto a las variables de carácter reproductivo, el método de propagación *in vitro* provocó un efecto menos favorable durante el primer año de cultivo en campo. Ese efecto retrasó la producción de las vitroplantas en aproximadamente 10-12 meses con respecto a las plantas regeneradas por

estaca. No obstante, el uso práctico del procedimiento de regeneración *in vitro*, no se descarta. Por el contrario, se sugiere su aplicación con el objetivo de establecer ciclos de propagación para el cultivar en estudio con vistas a rejuvenecer el material, debido a que por el método convencional de clonación por estaca, los campos envejecen gradualmente. También se recomienda su utilización para el manejo y conservación del germoplasma de guayabo con técnicas biotecnológicas (más seguras y eficientes).

4.2 Embriogénesis somática *in vitro* a partir de embriones cigóticos inmaduros del guayabo cv. Enana Roja Cubana.

4.2.1 Inducción del callo con estructuras embriogénicas a partir de embriones cigóticos.

4.2.1.1 Efecto del tipo y concentración de auxina en la inducción del callo con estructuras embriogénicas.

En la tabla 13, se muestra el efecto de los factores tipo y concentración de auxinas (2,4-D y Picloram) sobre la formación de callo primario y de callo con estructuras embriogénicas a partir de embriones cigóticos inmaduros de guayabo cv. Enana Roja Cubana. El análisis de varianza (ANOVA bifactorial) reveló diferencias significativas para la interacción. En sentido general se observó que ambos reguladores del crecimiento mostraron un efecto favorable en la inducción de la embriogénesis somática y que la respuesta estuvo más condicionada por la concentración utilizada en cada caso. Los mejores resultados se alcanzaron con el 2,4-D a las concentraciones de 5.0 y 10.0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ y el Picloram a 10.0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, los cuales mostraron los mayores porcentajes de formación de callo primario y de callo con estructuras embriogénicas. El uso de concentraciones iguales o mayores a 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, en ambos reguladores del crecimiento, provocó una disminución significativa del porcentaje de formación del callo primario, y en especial del callo con estructuras embriogénicas. En los tratamientos sin reguladores del crecimiento (0.0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) no ocurrió la formación de ninguno de los dos tipos de callos.

La observación morfológica de este proceso (Figura 8a-b), reveló que durante los primeros 15 d de iniciado el cultivo de los embriones cigóticos inmaduros en el medio de inducción, ocurrió un incremento en el volumen del explante y a los 30 d aproximadamente, se observó la formación de un callo de color pardo-amarillento, duro y compacto, que surgió fundamentalmente en los extremos del embrión cigótico inmaduro (Figura 8a). Este callo primario con su crecimiento cubrió el explante por

completo. Aproximadamente 20 d después, se comenzó a observar la formación menos frecuente de pequeñas porciones de un callo con apariencia muy nodular, friable al tacto y de color beige, denominado y cuantificado en este estudio como callo con estructuras embriogénicas (Figura 8b). En la superficie del callo aparecieron estructuras globulares traslúcidas semejantes a embriones, que de manera aislada y eventual, mostraron un desarrollo morfológico diferente, identificándose como embriones somáticos en etapas torpedo-cotiledonar (Figura 8b, flecha). La formación de este tipo de tejido o callo, también denominado “masas celulares pro-embriogénicas” (Merkle *et al.*, 1995), se reconoce como un elemento esencial para alcanzar procesos morfogenéticos con altas frecuencias de regeneración en especies leñosas (von Arnold *et al.*, 2002). Para Witjaksono y Litz (1999a), alcanzar la formación de este tipo de tejido se convirtió en un aspecto fundamental en el proceso de embriogénesis somática de *Persea americana* Mill.

En el guayabo, la información que existe sobre las características morfológicas de los tejidos formados durante la embriogénesis somática *in vitro*, es escasa y está dirigida fundamentalmente a la diferenciación de los embriones somáticos (Akhtar *et al.*, 2000). A pesar de lo anterior, algunos autores hicieron breves descripciones. Por ejemplo, Vilchez *et al.* (2002), al utilizar embriones cigóticos inmaduros del cultivar Enana Roja Cubana y cultivarlos con 2,4-D 4.5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, notificaron que durante las primeras dos semanas se formó un callo compacto, seco, de color marrón brillante y con estructuras embriogénicas, que guarda relación con el tejido descrito en este experimento. Otros estudios refieren aspectos que difieren completamente con las características señaladas anteriormente. Por ejemplo, Ramírez y Salazar (1998), informaron la formación de un callo de color verde claro y consistencia no friable y dura, con el uso de embriones cigóticos inmaduros de guayabo y medios de cultivos enriquecidos con diferentes concentraciones de citoquininas. Las diferencias morfológicas en unas y otras observaciones, indican que las características morfológicas de los tejidos formados durante la embriogénesis somática en el *P. guajava* dependen fundamentalmente del genotipo en estudio, del tipo de regulador del crecimiento y de las concentraciones utilizadas.

El papel de las auxinas, como principales reguladores del crecimiento en la inducción de la embriogénesis somática, está muy bien documentado en la literatura para muchas especies leñosas (Dustan *et al.*, 1995), incluyendo varios miembros de la familia *Myrtaceae* (Canhoto *et al.*, 1999; Nugent *et al.*, 2001; Guerra *et al.*, 2001; Stefanello *et al.*, 2005). El 2,4-D, es considerado el más eficiente y por tanto el regulador del crecimiento sintético más utilizado en la mayoría de los

sistemas de cultivos embriogénicos (Fehér *et al.*, 2003). Se ha demostrado que influye en el metabolismo de las auxinas endógenas, lo cual sugiere que juega un papel significativo en la formación del embrión somático. Además, puede actuar como herbicida, lo cual puede inducir respuesta por estrés en las células vegetales (Pasternak *et al.*, 2002).

En el guayabo, a diferencia de algunas *Myrtaceae* (Arruda *et al.*, 2000; Nugent *et al.*, 2001; Stefanello *et al.*, 2005), no existen antecedentes sobre el uso del Picloram para inducir la embriogénesis somática *in vitro* (Akhtar *et al.*, 2000; Vilchez *et al.*, 2001, 2002, 2004; Chandra *et al.*, 2004). En estos trabajos, solo se informó del uso del 2,4-D como principal regulador del crecimiento de carácter auxínico. Los resultados alcanzados con el Picloram en los embriones cigóticos de guayabo en este experimento, lo identificaron como un regulador del crecimiento potencialmente efectivo. Sin embargo, con el uso de concentraciones más bajas de 2,4-D se alcanzaron valores significativos en la formación de callo con estructuras embriogénicas. Por esa razón y a pesar de reconocerse el resultado favorable con el Picloram, se recomendó continuar los estudios con el uso del 2,4-D.

Los resultados obtenidos en este experimento, con relación a las concentraciones de auxinas (2,4-D y Picloram), coinciden favorablemente con los mejores resultados en la inducción de la embriogénesis somática *in vitro* en otras especies *Myrtaceae*, con rangos de 1-10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Canhoto *et al.*, 1999; Guerra *et al.*, 2001; Stefanello *et al.*, 2005). De igual forma concuerdan con las concentraciones de mejor respuesta en el guayabo (4.5-9.0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) (Akhtar *et al.*, 2000; Vilchez *et al.*, 2001, 2004; Chandra *et al.*, 2004), y en especial con los resultados alcanzados por Vilchez *et al.* (2002), quienes plantean que el uso de altas concentraciones de 2,4-D (22.6 y 45.2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), en el cultivar Enana Roja Cubana, provocaron una inhibición del proceso embriogénico.

Con frecuencia se ha señalado en otras especies, que elevados niveles de auxinas exógenas provocan disminuciones en el potencial embriogénico y se asocia a un efecto tóxico por parte del regulador del crecimiento (Baker y Wetzstein, 1994; Canhoto *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2002). No obstante, existen algunas excepciones como el eucalipto, en donde las concentraciones altas de Picloram o de AIB (50-100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) se comportaron como las más eficientes para inducir la formación del callo con estructuras embriogénicas (Nugent *et al.*, 2001).

La formación esporádica de algunos embriones somáticos en este experimento (figura 8b), estuvo relacionada con el agotamiento de la auxina exógena, ya que durante el proceso de desdiferenciación celular, los reguladores del crecimiento (auxinas) se consumen (Pasternak *et al.*, 2002; Fehér *et al.*,

2003). Una vez que disminuye la concentración, deja de existir el efecto exógeno y se promueve el desarrollo de células o grupos de células potencialmente capaces de diferenciar en estructuras embrionarias (von Arnold *et al.*, 2002). Sin embargo, no toda la superficie del callo, ni todos los callos formados, fueron capaces de diferenciar embriones somáticos. Esto pudo estar dado porque las competencias embriogénicas están determinadas fundamentalmente, por la sensibilidad de las células potenciales a las auxinas aplicadas de manera exógena (Dustan *et al.*, 1995).

De manera general, se observó un efecto favorable de ambos reguladores del crecimiento (Picloram y 2,4-D a 5.0-10.0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) en la inducción de un proceso de embriogénesis somática de tipo indirecta y de baja frecuencia en el guayabo cv. Enana Roja Cubana. Sin embargo, para continuar el trabajo se recomienda el uso de la menor concentración de auxina (2,4-D 5.0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) donde se obtuvieron altos índices de formación de callo con estructuras embriogénicas (44.0%). Además, se hace necesario continuar el estudio para optimizar el estado fisiológico de desarrollo de los embriones cigóticos inmaduros como explantes iniciales de este proceso.

4.2.1.2 *Efecto de la edad y tamaño del fruto en la inducción del callo con estructuras embriogénicas.*

En la tabla 14 se observan los resultados del efecto de la edad y tamaño del fruto sobre los índices de contaminación y fenolización, así como también sobre la expresión de las competencias embriogénicas de los embriones cigóticos. De manera general se observó un efecto significativo de la edad y tamaño del fruto en la respuesta embriogénica de los explantes.

Los índices de contaminación por hongo y bacteria, no mostraron diferencias estadísticas entre los frutos de diferentes edades. En cambio, el índice de fenolización de los embriones cigóticos sí mostró diferencias significativas, entre los explantes tomados de frutos con mayor edad y el resto de los tratamientos. La extracción del embrión cigótico se hizo más difícil con el aumento de la edad del fruto debido al incremento en la dureza de las cubiertas de las semillas. Esto provocó un mayor daño mecánico en el explante durante la escisión y un incremento de la fenolización.

Los porcentajes de formación de callo primario y de callo con estructuras embriogénicas fueron significativamente superiores en los explantes colectados de frutos de 45 d de edad. Este resultado demuestra que existe relación entre el potencial morfogénico del explante y su estado de desarrollo. Los menores niveles de respuesta se observaron con los embriones cigóticos extraídos de los frutos más jóvenes y de menor tamaño. En este caso la mayoría de los explantes no mostraron signos de

crecimiento de nuevos tejidos o callos. Similar comportamiento se señaló con anterioridad para embriones cigóticos en etapas globular y corazón, en el guayabo 'Enana Roja Cubana' (Vilchez *et al.*, 2002).

La inducción de la embriogénesis somática conlleva a un reemplazo en el programa genético de expresión normal en las células somáticas hacia un modelo de expresión embriogénico. Este cambio provoca una serie de divisiones celulares que produce callos con tejidos más o menos polarizados. No obstante, la iniciación de la vía embriogénica está restringida a ciertas células del explante inicial, las cuales poseen el potencial para activar los genes involucrados en la generación de células embriogénicas (von Arnold *et al.*, 2002), de ahí la importancia que tiene el explante. En las especies leñosas se considera que este factor tiene un papel muy importante en la inducción de la embriogénesis somática *in vitro* y son los tejidos embrionarios los que mejor responden (Dunstan *et al.*, 1995; von Arnold *et al.*, 2002). Akhtar *et al.* (2000) también arribaron a esta conclusión y afirmaron que los embriones cigóticos son el mejor explante para iniciar el cultivo *in vitro* y la embriogénesis somática en el guayabo.

El uso de los embriones cigóticos para inducir la embriogénesis somática *in vitro* es frecuente en las plantas de la familia *Myrtaceae* (Litz, 1984a, 1984b; Cruz *et al.*, 1990; Canhoto y Cruz, 1994; Guerra *et al.*, 1997). En el guayabo, fuera de este tipo de explante, solo se ha logrado la embriogénesis somática a partir del cultivo de anteras (Potinkis, 1996) y más recientemente a partir de tejidos somáticos del fruto inmaduro (Chandra *et al.*, 2004). En ambos casos se brinda poca información sobre los resultados obtenidos.

A pesar de que existen métodos más precisos para determinar el estado fisiológico de los embriones cigóticos, como es el caso de la apariencia morfológica total y el tamaño del embrión, la correlación del potencial embriogénico con los días transcurridos después de la polinización resulta una medición conveniente (Sotak *et al.*, 1991). Precisamente el hecho de que las semillas y embriones cigóticos de guayabo sean de tamaño pequeño y de grandes dificultades para su extracción, hicieron que este método de correlación fuera factible. En trabajos anteriores en el cultivar Enana Roja Cubana, se demostró que existe un alto coeficiente de correlación entre el tamaño de los frutos y la cantidad de embriones cigóticos en etapas globular, corazón, torpedo y cotiledonar (Vilchez *et al.*, 2002).

En las especies *Myrtaceae* la etapa de desarrollo de los embriones cigóticos es importante. Así, en *Myrtus communis* L. solamente las semillas inmaduras de dos meses de edad fueron capaces de producir embriones somáticos (Parra y Amo-Marco, 1999), mientras las semillas con cubiertas duras

(3-4 meses de edad) no produjeron embriones somáticos *in vitro*. Por su parte, en especies de *Eugenia* (Litz, 1984a) y en *Myrciaria cauliflora* (Litz, 1984b) los embriones somáticos fueron obtenidos únicamente cuando se utilizaron como explantes iniciales, embriones cigóticos tomados de frutillos en una etapa de desarrollo particular (longitud 0.8-1.6 cm en *Eugenia* y 0.7-0.9 cm en *Myrciaria*).

El desarrollo ontogenético de los embriones cigóticos en las semillas implica, no solo cambios en su morfología, sino también en aspectos bioquímicos, en especial la acumulación de determinadas proteínas (Sotak *et al.*, 1991), que hacen a las células del embrión cigótico más o menos divergentes en una etapa de desarrollo específica. Durante los primeros 42-45 d después de la antesis, los frutos de guayabo se encuentran en un período de rápido crecimiento (Laguado *et al.*, 1999a), y es durante este período donde existe la mayor posibilidad de hallar frutos con mayor cantidad de embriones cigóticos que no llegan a la etapa de desarrollo de embrión maduro (Vilchez *et al.*, 2002). A partir de los 45 d se inicia el proceso de maduración de la semilla que se extiende hasta los 65 d después de la antesis aproximadamente (Laguado *et al.*, 1999a).

Los resultados de este experimento, no coincidieron en cuanto a la edad de los frutos (25-35 d) de mejor respuesta señalada por Vilchez *et al.* (2002). Sin embargo, sí concuerdan con respecto al diámetro promedio de los frutos (3.5-3.8 cm). Los contrastes en cuanto a la edad y el tamaño de los frutos son frecuentes, y están asociados a diferencias en las condiciones ambientales, lo cual influye significativamente en el ciclo de crecimiento y desarrollo de los frutos (Araujo *et al.*, 1997; Laguado *et al.*, 1999a). Pese a esto, la respuesta de los embriones cigóticos con relación al porcentaje de formación de callo con estructuras embriogénicas en este estudio (42.0%) fue superior. Vilchez *et al.* (2002) alcanzaron el mayor valor de formación de callo con estructuras embriogénicas con embriones cigóticos en etapas de desarrollo torpedo (12.0%) y cotiledonar (7.7%). Esto puede estar relacionado con diferencias en cuanto a la etapa de desarrollo de los embriones cigóticos utilizados como explantes. Es muy probable que en los frutos de 45 d de edad después de la antesis, los embriones cigóticos se encuentren en etapas más avanzadas de desarrollo.

En contradicción con los resultados anteriores, Akhtar *et al.* (2000) señalaron los mejores resultados con embriones cigóticos de frutos de 10 semanas de edad. Las diferencias en este sentido pudieran estar asociadas al genotipo, a las condiciones climáticas de cultivo de las plantas donadoras y a las condiciones de cultivo *in vitro* manejadas para la inducción. Estos autores utilizaron el 2,4-D a una concentración de 0.5 mg.L^{-1} ($2.3 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) y un fuerte estrés osmótico proporcionado por 10% (m/v) de sacarosa, durante 8 días.

A partir de los resultados obtenidos en este experimento, se concluye que los embriones cigóticos deben ser colectados de frutos de 45 d de edad después de la anthesis y aproximadamente 3.4 cm de diámetro ecuatorial, para alcanzar aproximadamente un 42% de inducción de callo con estructuras embriogénicas. Sin embargo, el tamaño relativamente pequeño del callo con estructuras embriogénicas, trajo consigo insuficiencias en las cantidades de material vegetal para iniciar experimentos relacionados con la histodiferenciación de las estructuras embrionarias en medio líquido. Por ese motivo se hizo necesario abordar un estudio sobre las condiciones de cultivo para la proliferación de los tejidos con estructuras embriogénicas en medio semisólido.

4.2.2 Proliferación del callo con estructuras embriogénicas de guayabo.

4.2.2.1 Efecto de la concentración de 2,4-D sobre la proliferación del callo con estructuras embriogénicas.

En la tabla 15 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D en el medio de proliferación, después de 90 días de cultivo, sobre el incremento de la masa fresca del callo con estructuras embriogénicas, el porcentaje de formación y número de embriones somáticos en etapas avanzadas de desarrollo (torpedo y cotiledonar). De manera general se observó un efecto significativo de la concentración de 2,4-D en los resultados.

Con la concentración de 2,4-D $7.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ se alcanzó el mayor incremento en la masa fresca, significativamente superior al resto de las concentraciones. El tratamiento donde la concentración de 2,4-D se mantuvo igual a las condiciones de inducción ($5.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$), mostró un incremento menos pronunciado en la masa fresca, no obstante, estadísticamente superior a los tratamientos restantes ($2.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ y testigo). En éstos dos últimos tratamientos, los incrementos en masa fresca fueron significativamente los más bajos y sin diferencias estadísticas entre sí. El principal contraste se observó desde el punto de vista cualitativo, ya que en los callos del tratamiento testigo (sin subcultivos de proliferación) se inició un proceso degenerativo en el potencial morfogénico, pues se formó un tejido no-embriogénico de color pardo, blando al tacto y consistencia acuosa (Figura 9a). También ocurrió el desarrollo de embriones somáticos que alcanzaron etapas avanzadas (torpedo y cotiledonar), pero con limitaciones evidenciadas en su morfología (arqueados o retorcidos, con cotiledones pegados y con un crecimiento posterior atrofiado).

Conforme con el crecimiento del callo con estructuras embriogénicas, en todos los tratamientos con subcultivos de proliferación, ocurrió un aumento gradual de la formación de embriones somáticos en

diferentes regiones de la superficie, convirtiéndose el explante en una masa heterogénea de células proembriogénicas y embriones somáticos con un mayor o menor grado de diferenciación. Este fenómeno de asincronía, provocó que sobre un mismo callo se observasen embriones somáticos en etapas ontogenéticas diferentes (Figura 9b). A pesar de que las etapas globular-corazón fueron las más abundantes, estas estructuras no pudieron ser cuantificadas debido a sus características de crecimiento en grupos, tamaño pequeño y número elevado. Solamente fue posible registrar la cantidad de estructuras o embriones somáticos en etapas de desarrollo más avanzadas, o sea de torpedo a cotiledonar.

Al analizar estadísticamente el porcentaje de formación de embriones somáticos en etapas torpedo-cotiledonar, así como el número de estos tipos de embriones somáticos por explante (Tabla 15), se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Los callos que recibieron subcultivos de proliferación en medios de cultivo con 2,4-D $5.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ y $7.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, mostraron valores significativamente inferiores a los callos que no se subcultivaron (tratamiento testigo). Mientras, en los callos que se transfirieron a medios de proliferación con el 2,4-D $2.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, se obtuvieron valores intermedios.

La exposición a las auxinas es esencial para la inducción del estado embriogénico, sin embargo el cultivo continuado en altos niveles exógenos es perjudicial para la histodiferenciación (von Arnold *et al.*, 2002; Fehér *et al.*, 2003; Jiménez, 2005). Por esa razón, en el tratamiento testigo, el valor promedio del porcentaje de formación de embriones somáticos en etapas avanzadas y el número de éstos embriones por explante, fueron 2-3 veces mayor que en los tratamientos con 2,4-D 5.0 y $7.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$. De acuerdo con von Arnold *et al.* (2002), cuando los cultivos embriogénicos no se transfieren regularmente a medio fresco se inicia el desarrollo paulatino de los embriones somáticos. Esto indica que en el tratamiento testigo ocurrió un agotamiento del regulador del crecimiento auxínico, que provocó una situación de estrés suficiente para promover la mayor frecuencia de desarrollo de los embriones somáticos a etapas más avanzadas. Pero en este caso con limitaciones que provocan la aparición de embriones anormales, debido también al posible agotamiento en el medio de cultivo de otros compuestos importantes para el proceso.

La inhibición del desarrollo de las masas celulares pro-embriogénicas en embriones somáticos, está probablemente ocasionada por la inhabilitación de la polaridad eléctrica celular (von Arnold *et al.*, 2002; Fehér *et al.*, 2003; Jiménez, 2005). De acuerdo con estos autores, en presencia de auxinas exógenas, el desarrollo de los embriones somáticos solo alcanza las etapas globular-corazón

temprano. En este estudio, en los tratamientos con 2,4-D 7.5 y 5.0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, se reconoció ese efecto inhibitor, aunque menos acentuado, pues siempre ocurrió la formación de embriones somáticos en etapas torpedo-cotiledonar.

Con frecuencia se plantea también que largos períodos en altas concentraciones de auxinas durante la fase de proliferación provocan una morfología anormal en los embriones somáticos y el desarrollo de embriones somáticos secundarios (Cruz *et al.*, 1990; Baker y Wetzstein, 1994). En este experimento, por el contrario, en los tratamientos con 2,4-D 7.5 y 5.0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ donde el crecimiento (masa fresca) del callo con estructuras embriogénicas fue superior, se mantuvieron las características friables y nodulares de este tejido y ocurrió la formación de embriones somáticos en etapas avanzadas con una adecuada morfología (Figura 9c). Este comportamiento puede estar ocasionado porque esas concentraciones de 2,4-D se encuentran dentro del rango de mejor resultado en la inducción (experimento 4.2.1.1) o a que el tiempo de cultivo no se prolongó más allá de los 90 d en esas condiciones. El mayor incremento en la masa fresca en estos tratamientos, en especial para el 2,4-D 7.5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, no está asociado a un incremento en el número de embriones en etapas avanzadas, sino a un incremento en el volumen del callo con estructuras embriogénicas globulares.

En los pocos trabajos de embriogénesis somática que existen en el guayabo, la información concerniente a la proliferación de los tejidos con estructuras embriogénicas, es escasa o imprecisa (Ramírez y Salazar, 1998; Chandra *et al.*, 2004). Al respecto, Akhtar *et al.* (2000), señalaron que para perpetuar el cultivo embriogénico en el guayabo se utiliza un sistema de embriogénesis secundaria o recurrente, en la cual los embriones somáticos se colocan como nuevas unidades de explantes para comenzar un nuevo ciclo de inducción. Además, aseguraron que el potencial para la embriogénesis recurrente varía con las diferentes etapas de desarrollo del embrión somático. Para el cultivar Enana Roja Cubana en particular, se informó recientemente un procedimiento de proliferación por embriogénesis recurrente, que permitió alcanzar un máximo de 48.5 embriones somáticos secundarios (globular-corazón) por explante (grupo de ± 35 embriones somáticos globular-corazón), y destaca el uso de 2,4-D 2.26-9.05 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ en el proceso (Vilchez *et al.*, 2004). Sin bien este procedimiento permitió regenerar grandes cantidades de embriones somáticos globular-corazón, tiene como inconveniente que discriminó una cantidad importante de callo con características embriogénicas que podrían haberse aprovechado para la histodiferenciación. Estos tejidos, en aplicaciones relacionadas con el mejoramiento genético, pueden llegar a ser determinantes. Por esa razón en este estudio se realizó la proliferación de toda la masa heterogénea de callo con estructuras embriogénicas.

El método de proliferación del callo con estructuras embriogénicas en presencia de 2,4-D $7.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, posibilitó incrementar la biomasa del cultivo manteniendo las cualidades embriogénicas del mismo. Esto permitió abordar experimentos relacionados con la histodiferenciación y el desarrollo de los embriones somáticos de esta especie.

4.2.3 Histodiferenciación y desarrollo de los embriones somáticos de guayabo.

4.2.3.1 Efecto de la sacarosa y el ABA en la histodiferenciación y calidad de los embriones somáticos regenerados.

Histodiferenciación: En todos los tratamientos se observó la histodiferenciación de embriones somáticos en etapas torpedo y cotiledonar. No obstante, las características asincrónicas del cultivo se mantuvieron con el predominio de los embriones somáticos en etapas globular-corazón, que fueron imposibles de cuantificar. El análisis de varianza (ANOVA bifactorial) realizado a la interacción de los factores concentración de sacarosa y concentración de ABA sobre el número de embriones somáticos torpedo y cotiledonar, reveló que no existían diferencias significativas ($p \geq 0.05$). Sin embargo, al analizar cada factor por separado, sí se observaron diferencias estadísticas entre los niveles ensayados (Tabla 16). En general, una mayor cantidad de embriones somáticos en etapas avanzadas de desarrollo, se identificó con una influencia positiva de las condiciones de cultivo en la histodiferenciación de estas estructuras.

Para la sacarosa, los mejores resultados se alcanzaron con la concentración de 60.0 g.L^{-1} , donde el número de embriones somáticos torpedo y cotiledonar fue significativamente superior. Para el ABA, las mayores cantidades de embriones somáticos torpedo y cotiledonar se alcanzaron en concentraciones de 10.0 - $25.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Sin embargo, para la concentración de ABA $10.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ el número de embriones totales mostró valores intermedios. En ausencia de ABA los resultados fueron los más bajos y sin diferencias significativas con la concentración de $5.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, que se mostró insuficiente, en especial con relación al número de embriones somáticos cotiledonares. En general, los embriones somáticos en etapa cotiledonar fueron siempre minoría en todos los tratamientos ensayados. Además del efecto positivo de la sacarosa y el ABA sobre el desarrollo de los embriones somáticos en etapas avanzadas, se observó un incremento en la calidad del callo con estructuras embriogénicas (Figura 10a).

El mejor resultado se obtuvo con la combinación de sacarosa 60.0 g.L^{-1} y ABA $15.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, no solo por alcanzar las mayores cantidades de embriones de cada tipo, sino también, por mostrar las

menores diferencias cuantitativas entre ambos tipos de embriones somáticos (datos no mostrados), hecho que reflejó una mayor uniformidad del cultivo. Los embriones somáticos transcurrieron por diferentes etapas de desarrollo (Figura 10b-d) que guardaron una completa correspondencia con las etapas ontogenéticas del embrión cigótico, aspecto que coincide con observaciones de otros autores (Akhtar *et al.*, 2000; Vilchez *et al.*, 2002). El uso de sacarosa 30 g.L⁻¹ en ausencia de ABA, mostró los resultados más bajos en cuanto a las cantidades de embriones somáticos en etapas avanzadas de desarrollo (torpedo-cotiledonar) (Figura 10e).

Germinación: En los embriones somáticos en etapas avanzadas de desarrollo, que se colocaron en un medio MS 50% sin reguladores del crecimiento, se promovió la germinación *in vitro*, la cual se hizo morfológicamente visible a los 10 d de cultivo, aproximadamente. El proceso de germinación de los embriones somáticos en etapas torpedo-cotiledonar (Figura 11a-f) ocurrió gradualmente y se caracterizó por un cambio de coloración en los cotiledones y el eje embrionario, y una visible zona divisoria del crecimiento de la raíz y el hipocótilo. También se observaron diversos tipos de anomalías. Por esa razón, la germinación se clasificó en dos variables: la germinación normal, identificada por el crecimiento y desarrollo en ambos extremos del eje embrionario: raíz y brote (Figura 11b); y la germinación total, que incluyó la germinaciones normales y las fuera de tipo (Perán-Quesada *et al.*, 2004). Estas últimas se caracterizaron por la expansión de los cotiledones y el crecimiento del hipocótilo exclusivamente (Figura 11c) o simplemente por el crecimiento de la raíz, con o sin aberraciones incluidas (Figura 11d). Otro aspecto que caracterizó el proceso de germinación fue la formación de embriones somáticos secundarios en la base de los embriones somáticos primarios en germinación (Figura 11f). La formación continua de estas nuevas estructuras embriogénicas dio lugar a grupos o agregados de numerosos embriones somáticos unidos fundamentalmente por la región del polo radicular (Figura 11g). De este modo, una mayor calidad y cantidad en la germinación *in vitro* de los embriones somáticos, se asumió como el resultado de un efecto favorable del proceso de histodiferenciación que se llevó a cabo.

El análisis de varianza (ANOVA bifactorial) no mostró significación para la interacción de los factores concentración de sacarosa y concentración de ABA, utilizadas durante la histodiferenciación, con relación al porcentaje de germinación (total y normal) y formación de embriones secundarios, ocurrida en la fase de germinación. Sin embargo, el análisis de los factores por separado sí produjo diferencias estadísticas para los diferentes niveles ensayados (Tabla 17).

La concentración de sacarosa utilizada durante la histodiferenciación de los embriones somáticos, tuvo un efecto marcado en las variables porcentaje de germinación normal y formación de embriones secundarios, no así para la germinación total, donde no se observaron diferencias significativas en este factor. El mayor porcentaje de germinación normal ocurrió en los embriones somáticos que fueron histodiferenciados en medios de cultivos enriquecidos con sacarosa 60.0 g.L^{-1} . De igual forma sucedió con la formación de embriones secundarios, que fue significativamente superior en los embriones somáticos histodiferenciados en presencia de sacarosa 60.0 g.L^{-1} .

La concentración de ABA que se utilizó durante la histodiferenciación de los embriones somáticos de guayabo tuvo un efecto marcado en todas las variables evaluadas en la fase de germinación (Tabla 17). En los embriones somáticos histodiferenciados en presencia de ABA, se observó un efecto favorable en la germinación. El incremento de la concentración de ABA durante la histodiferenciación favoreció el porcentaje de germinación total, hasta alcanzar los mayores valores (81-72%) en concentraciones de $15.0\text{-}25.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$. No obstante, a la concentración de ABA $25.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ se observó un valor intermedio en el porcentaje de germinación total, que puede ser considerado el comienzo de una declinación en esta variable. Al respecto, Vilchez *et al.* (2004) alcanzaron el mayor porcentaje de germinación (83.4%) con agregados de 20 embriones somáticos secundarios en medio MS (50% macronutrientes), sacarosa 20.0 g.L^{-1} , Biobras-6 (Centro de Productos Naturales, Universidad de la Habana, Cuba) 10.0 mg.L^{-1} y BAP 0.25 mg.L^{-1} . En ese mismo medio, los embriones somáticos colocados individualmente, sólo mostraron aproximadamente un 60% de germinación. Este aspecto será comentado en experimentos subsiguientes con mayor profundidad.

Algo similar ocurrió con relación al porcentaje de embriones somáticos que germinaron de forma normal. El uso de ABA durante la histodiferenciación de los embriones somáticos favoreció la germinación normal, con la excepción de los embriones somáticos histodiferenciados en ABA $5.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, que no mostraron diferencias significativas con los formados en ABA $0.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Estos resultados indican que en ausencia del ABA o en bajas concentraciones, la histodiferenciación de los embriones no se logró adecuadamente, y a pesar de que manifestaron porcentajes de germinación total superiores al 60%, los porcentajes de germinación normal fueron significativamente bajos. Esta diferencia entre una y otra variable fue disminuyendo con el aumento de la concentración de ABA, aspecto que explica un efecto positivo en el proceso de histodiferenciación.

Contrario al efecto sobre la germinación total y normal, la concentración de ABA que se utilizó en la histodiferenciación de los embriones somáticos, se mostró desfavorable para la formación de embriones secundarios durante la fase de germinación. Con excepción de los embriones somáticos histodiferenciados en la concentración de $5.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, que no mostró diferencias significativas con ABA $0.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, en el resto se observó una inhibición significativa del proceso de embriogénesis secundaria o recurrente, que se hizo más intensa con el aumento de la concentración de ABA.

Las *Myrtaceae*, en su mayoría, se caracterizan por la capacidad de generar eventos espontáneos de histodiferenciación con un alto nivel de asincronía durante las fases de inducción y proliferación (Canhoto y Cruz, 1996; Guerra *et al.*, 1997; Canhoto *et al.*, 1999; Parra y Amo-Marco, 1999). En el *P. guajava* este fenómeno también es frecuente (Vilchez *et al.*, 2002, 2004; Chandra *et al.*, 2004), y se hace mayor cuando se colocan los explantes en medios de cultivo sin reguladores del crecimiento (Akhtar *et al.*, 2000).

La simple colocación de los embriones somáticos en medios libres de auxinas exógenas para la fase de histodiferenciación, no garantiza un ambiente libre de esos reguladores del crecimiento para una apropiada diferenciación. Se conoce que el embrión somático y las masas celulares embriogénicas tienen la capacidad de conjugar auxinas que son excretadas al medio durante el proceso (Michalczyk *et al.*, 1992). Por esa razón las condiciones de cultivo deben ser cambiadas de manera secuencial durante el desarrollo del embrión somático y su germinación (Von Arnold *et al.*, 2002).

Los trabajos más recientes sobre embriogénesis somática en el guayabo hacen poco énfasis (Akhtar *et al.*, 2000), o no evalúan (Vilchez *et al.*, 2002, 2004; Chandra *et al.*, 2004), el efecto de factores como la concentración de sacarosa y el ABA en la histodiferenciación de los embriones somáticos. En estos trabajos se planteó que los embriones somáticos de guayabo maduran simultáneamente con el desarrollo progresivo del cultivo, desde la etapa globular hasta torpedo elongado, y germinan rápidamente una vez que son subcultivados en medio fresco de similar o modificada composición (Akhtar *et al.*, 2000).

Contrario a los pocos esfuerzos realizados en los trabajos anteriores, en el presente estudio se utilizaron diferentes variables, no solo para indicar la cantidad, sino también, la calidad que alcanzaron los embriones somáticos de guayabo durante el proceso de histodiferenciación. A través de ellos se demostró que el uso de un período de 30 d de cultivo en medio semisólido, con concentraciones de sacarosa 60.0 g.L^{-1} en combinación con ABA $10.0\text{-}20.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Tabla 16), fue conveniente para obtener el mayor número de embriones somáticos torpedo y cotiledonar, a pesar de que no se observó

una distinción en la frecuencia de formación de éstas estructuras. Algo similar ocurrió en el aguacate, donde exposiciones de los cultivos embriogénicos a concentraciones de ABA en un rango de 1 a 1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, durante 4-12 semanas, no tuvieron un efecto muy claro en la frecuencia de formación de embriones blanco-opacos (maduros), aunque si propiciaron un incremento en el número promedio de estas estructuras comparados con el testigo (Perán-Quesada *et al.*, 2004). Este comportamiento se asocia con el efecto combinado que producen ambos elementos en la regulación del proceso de histodiferenciación y maduración de los embriones somáticos, aspecto que se comprobó en otras especies de plantas (Merkle *et al.*, 1995; von Arnol *et al.*, 2002; Jiménez, 2005).

El ABA y el estrés osmótico promueven la expresión de genes responsables de la síntesis y acumulación de proteínas abundantes en la etapa final de la embriogénesis (en inglés *LEA proteins*) (Dodeman *et al.*, 1997). En *Hevea brasiliensis*, la presencia de ABA y alta concentración de sacarosa en el medio de cultivo favoreció la acumulación de almidón y proteínas de reserva en el embrión somático (Etienne *et al.*, 1993). En embriones cigóticos de *Brassica napus* se demostró que el ABA es un regulador efectivo del contenido de lípidos (Finkelstein y Somerville, 1989), y de igual forma en embriones somáticos de *Apium graveolens* L. (Kim y Janick, 1991).

En las coníferas, los procesos de histodiferenciación-maduración están más estudiados y se conoce que la presencia de ABA es obligada para detener la poliembrionía de partición y lograr que los embriones somáticos, lleven a cabo el proceso de histogénesis, diferenciación y maduración hasta alcanzar la etapa cotiledonar (Klimaszewska y Cyr, 2002). En las Angiospermas, aún existen contradicciones en cuanto a las funciones de este regulador del crecimiento (von Arnol *et al.*, 2002; Jiménez, 2005). Las más frecuentes están relacionadas con el incremento en el número de embriones somáticos en etapas avanzadas de desarrollo (González *et al.*, 2000), con la prevención de germinación precoz y desarrollo aberrado durante la histodiferenciación (Sharma *et al.*, 2004; García-Martín *et al.*, 2005), así como, la inhibición de la embriogénesis secundaria (Mauri y Manzanera, 2004). En *Morus alba*, el ABA mostró una drástica disminución en el porcentaje de formación de embriones secundarios con el aumento de la concentración de 0.1 a 7.0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ y manifestó una completa inhibición a los 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Agarwal *et al.*, 2004).

Estos aspectos se lograron demostrar también en el guayabo cv. Enana Roja Cubana con este estudio donde, el uso del ABA 15.0-20.0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, minimizó la diferencia entre el porcentaje de germinación total y el porcentaje de germinación normal. Indicativo de un menor número de germinaciones fuera de tipo en los embriones histodiferenciados bajo estas condiciones. Adicionalmente, se observó una

significativa disminución en el porcentaje de formación de embriones secundarios durante la germinación de los embriones primarios histodiferenciados en altas concentraciones de ABA.

Otros trabajos exponen efectos contradictorios en relación a los resultados alcanzados en este experimento. Recientemente, en cultivos embriogénicos de zanahoria se informó la inducción de embriones somáticos secundarios y terciarios cuando el ABA fue añadido al medio de cultivo (Ogata *et al.*, 2005). Asimismo, durante la inducción de embriones somáticos secundarios en *Rosa híbrida* cv. 'Carefree Beauty', se observó un efecto favorable del ABA en el incremento de este proceso (Li *et al.*, 2002). No obstante, también se observó un incremento en la frecuencia de germinación de estos embriones con respecto a los tejidos crecidos en BAP y TDZ.

En cuanto a la concentración de sacarosa los resultados alcanzados en este experimento demostraron un efecto positivo. El uso de sacarosa 60 g.L⁻¹ durante la histodiferenciación produjo un incremento significativo en el número de embriones somáticos torpedo y cotiledonar (Tabla 16), y en el porcentaje de formación de embriones secundarios durante la germinación (Tabla 17). Estos resultados coinciden con Agarwal *et al.* (2004), quienes utilizando sacarosa 6.0% (m/v) (también en combinación con ABA) alcanzaron en *Morus alba* L. las mayores proporciones de embriones somáticos cotiledonares (7%) y los mayores porcentajes de embriones somáticos secundarios (80.45%). La sacarosa, actúa como regulador osmótico en el medio de cultivo (Witjaksono y Litz, 1999b; Mauri y Manzanera, 2003), pero además constituye la principal fuente carbonada en el proceso embriogénico (Blanc *et al.*, 1999). Esta doble actividad caracteriza la función de los azúcares en la embriogénesis somática *in vitro* (von Arnol *et al.*, 2002).

La ocurrencia de embriogénesis secundaria durante la germinación se observó en todos los tratamientos en estudio, sin embargo, esta variable fue significativamente mayor en presencia de sacarosa 60.0 g.L⁻¹, aspecto que se consideró inapropiado para la calidad de la germinación. La embriogénesis repetitiva puede tener lugar en otras etapas del desarrollo embriogénico y se considera la más adecuada durante la proliferación en medio líquido que tiene lugar en forma de masas proembriogénicas (en inglés *PEMs*) (Merkle *et al.*, 1995).

Los embriones somáticos secundarios, se originaron fundamentalmente a partir de la región basal de los embriones somáticos primarios colocados en germinación y se caracterizaron por ser de mayor tamaño y mantener un desarrollo morfológico más completo. Este tipo de embriogénesis secundaria se ha observado en otras especies, sobre todo, cuando los embriones somáticos primarios alcanzaron una etapa de desarrollo cotiledonar, donde el proceso de embriogénesis recurrente se basa en la

proliferación de la caliptra del embrión somático primario que genera, tras una formación de meristemas en múltiples zonas de su superficie, desarrollos embriogénicos secundarios de tipo multicelular (Puigderrajols *et al.*, 1996; Celestino *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos hasta aquí, permiten reconocer el uso combinado de sacarosa 60.0 g.L^{-1} y ABA $15.0 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, durante la histodiferenciación, para lograr cantidades apropiadas de embriones somáticos torpedo-cotiledonar y a la vez, alcanzar los mejores resultados durante la germinación. No obstante, el uso de otras condiciones, como el medio de cultivo líquido, pudiera resultar ventajoso para mejorar la histodiferenciación e incrementar el número de embriones somáticos cosechados.

4.2.3.2 *Efecto del tamaño de los agregados celulares en la histodiferenciación de los embriones somáticos en medio de cultivo líquido.*

Los callos con estructuras embriogénicas cultivados en medio líquido desarrollaron un rápido proceso de desagregación, debido a las características morfológicas de friabilidad de este tejido, dando lugar a suspensiones celulares heterogéneas. En éstas se observaron en un mismo momento células dispersas y agregados celulares de diferentes tamaños, con o sin embriones somáticos globulares en su superficie, así como algunos embriones globulares individuales disgregados en el medio de cultivo (Figura 12a). Durante los primeros siete días de cultivo se observó el crecimiento de nuevos tejidos que fueron identificados, por la coloración blanco-opaca, como crecimiento activo de nuevas estructuras embriogénicas globulares. También ocurrió el oscurecimiento de los agregados celulares o fragmentos de callo de mayor tamaño, producto a la fenolización de este tejido.

Luego del cribado de las suspensiones celulares heterogéneas se apreció una mayor uniformidad en el cultivo con relación al tamaño de los agregados. En las fracciones mayores (II, III y IV) existió una disminución en las cantidades de agregados celulares pequeños y células dispersas (datos no mostrados). En la fracción I (0-250 μm), ocurrió lo contrario. A los 21 d de cultivo en el medio de histodiferenciación (WPM + ABA $15 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ + sacarosa 60.0 g.L^{-1}), para todas las fracciones de cultivo, a excepción de la de menor tamaño, se manifestó un cambio favorable en las suspensiones celulares en cuanto al desarrollo de las estructuras embriogénicas (Figura 12b-d).

Morfológicamente se observaron cambios en el desarrollo de las estructuras redondeadas de color blanco-opaco y superficie lisa que se identificaron como embriones somáticos en etapa globular. Estas estructuras se encontraban unidas, en unos casos a un centro común poco visible formando grupos de embriones, y en otros, a la superficie de agregados celulares pro-embriogénicos (Figura

12b). Los principales cambios se produjeron en el aumento gradual del tamaño de las estructuras globulares y en una leve elongación de éstas en dirección opuesta al agregado celular o al centro común al cual estaban unidas. A continuación se observó un desarrollo polarizado con la formación de primordios cotiledonares en la región distal del embrión somático dando lugar a la etapa corazón. Todos estos cambios ocurrieron de forma continua y asincrónica, por tanto se observaron embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo sobre un mismo agregado celular o formando parte de un mismo grupo (Figura 12c). De esta forma, el desarrollo del embrión somático continuó con la elongación del eje central o hipocótilo y el crecimiento posterior de los cotiledones hasta alcanzar las etapas subsiguientes de torpedo y cotiledonar, respectivamente.

Normalmente el desarrollo de los embriones ocurrió estando éstos unidos por la región basal o proximal, dando lugar a un tipo de congregación que se denominó agregado o grupo de embriones, mientras, el tejido o agregado celular que los mantuvo unidos se identificó como matriz. En ocasiones no fue posible visualizar ese tejido matricial debido al número de estructuras que conformaban el agregado de embriones (Figura 12c, flecha). Del mismo modo, se pudo apreciar que los embriones somáticos más desarrollados y de mayor tamaño se desprendían de esos agregados, debido principalmente a la acción mecánica de fricción durante la agitación en el medio líquido (Figura 12d).

La embriogénesis somática secundaria se puede identificar como la principal causa de la formación de estos grupos de embriones, fenómeno que se manifestó en una frecuencia muy elevada (dato no mostrado). Esto puede deberse al corto período de cultivo bajo las condiciones de maduración con ABA, al efecto de la alta concentración de sacarosa o a las propias ventajas del cultivo en medio líquido, que son reconocidas por otros autores (von Arnold *et al.*, 2002; Mauri y Manzanera, 2003).

Al analizar el efecto del tamaño de los agregados sobre la cantidad de embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo (Tabla 18), histodiferenciados en medio líquido, se puede observar que las fracciones I y II (250-500 μm y 500-1000 μm) alcanzaron la mayor cantidad de embriones somáticos por mililitro (233 y 226, respectivamente), sin diferencias significativas entre sí, pero estadísticamente superiores a las fracciones restantes. Cualitativamente también se destacaron, pues en estas fracciones se logró la mayor cantidad de embriones somáticos en etapas avanzadas (más de 45 embriones somáticos/mL en etapas torpedo-cotiledonar para cada fracción). No obstante, en ambas fracciones, siempre se cuantificó un gran número de embriones somáticos en etapas globular-oblongo, dando muestras de ser aún un cultivo heterogéneo en este sentido. La etapa de desarrollo menos frecuente fue la de corazón. Se conoce que esta etapa de desarrollo es transitoria entre el

globular-oblongo y el torpedo, con un breve período de tiempo por una rápida elongación del eje embrional o hipocótilo (von Arnold *et al.*, 2002). Por ello resultó difícil cuantificar mayores cantidades de este tipo de embrión. Además los cambios morfológicos entre estas etapas son poco perceptibles lo que tiende a confundirse con la etapa torpedo en sus momentos iniciales.

El tamaño de los agregados celulares fue uno de los factores determinantes en el número de embriones somáticos inducidos en cultivos de suspensiones celulares embriogénicas de zanahoria en medio líquido (Ibaraki *et al.*, 2000). De igual forma ocurrió para el guayabo en este experimento, donde se pudo apreciar que los agregados celulares de mayor tamaño ($>1000\ \mu\text{m}$) y las células dispersas y los agregados celulares más pequeños ($0-250\ \mu\text{m}$) requieren ser eliminados de la suspensión celular heterogénea para alcanzar los mayores rendimientos, en especial de embriones en etapas torpedo y cotiledonar. No obstante, sería interesante abordar en estudios posteriores, los aspectos relacionados con el cultivo de suspensiones celulares finas, para evaluar la capacidad de ese sistema de cultivo en el desarrollo de la embriogénesis somática del guayabo. Por el momento en este experimento solo se proyectó utilizar las condiciones del medio de cultivo líquido, para facilitar la manipulación de los callos con estructuras embriogénicas e incrementar los rendimientos de la histodiferenciación, que se obtuvieron anteriormente en medio de cultivo semisólido (Epígrafe 4.2.3.1).

El uso del medio líquido para la histodiferenciación de embriones somáticos es menos frecuente que para la proliferación de los embriones (Merkle *et al.*, 1995). Sin embargo, en varias especies leñosas, como el *Quercus ilex* L., el cultivo de los embriones somáticos en medio líquido tuvo varias ventajas, entre las que sobresalieron: alta frecuencia de multiplicación, rápido crecimiento de los embriones somáticos en tamaño y masa fresca, facilidad en la absorción de nutrientes, los embriones somáticos se destacan más del callo, se reduce la labor de subcultivo y se facilita la automatización en bioreactores (Mauri y Manzanera, 2003). Estas ventajas también pudieran ser aplicables al guayabo. No obstante, en la literatura revisada no se encontraron antecedentes sobre el uso del medio líquido en las fases de proliferación e histodiferenciación de embriones somáticos en guayabo. Solo se encontró un trabajo reciente que informó el uso de medio de cultivo líquido en sistemas de inmersión temporal RITA[®], pero para la fase de germinación *in vitro* de embriones somáticos secundarios (Gómez-Kosky *et al.*, 2005). Esos resultados fueron muy satisfactorios e incrementaron las ventajas favorables al medio líquido.

En el cafeto (*Coffea canephora* P. var. Robusta), se utilizó con éxito un sistema de cultivo en medio líquido MS enriquecido con ABA $0.5-2.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, para la regulación del desarrollo de los embriones

somáticos (González *et al.*, 2000). Estos autores señalaron rendimientos de 1000-1185 embriones totales en 20 mL de medio de cultivo, con más del 60% de los embriones en etapa torpedo, significando una mayor sincronía con respecto al tratamiento control sin ABA. Por el contrario en el guayabo, en este experimento, el desarrollo de embriones secundarios no se pudo controlar y aunque provocó un incremento favorable en la cantidad total de embriones, y en especial de embriones en etapas torpedo-cotiledonar, el nivel de asincronía no disminuyó.

Los análisis de viabilidad realizados a los cultivos embriogénicos de guayabo en este experimento, revelaron más de un 95% de supervivencia en los embriones somáticos en todas las etapas de desarrollo, especialmente en aquellos embriones somáticos de mayor edad (Figura 13a). Además demostraron que la matriz central que sostiene los embriones somáticos, no manifestó viabilidad en ninguno de los casos muestreados (Figura 13b).

Lo anterior demuestra que la matriz central actúa como tejido nodriza y es capaz de regenerar embriones en una alta frecuencia a expensas de su propio desgaste, tal y como lo hacen los tejidos de nucelas en muchas especies frutales. El uso de los tejidos nucelares para el desarrollo de sistemas de embriogénesis somática *in vitro* se ha señalado en varias ocasiones (Litz *et al.*, 1998; Cardoza y D'Souza, 2002). Sin embargo, muy poca información existe sobre los tejidos que bajo condiciones *in vitro* adoptan esas funciones. En las gimnospermas existen más estudios al respecto. De acuerdo con Filonova *et al.* (2000), la embriogénesis somática *in vitro* de *Picea abies* involucra dos olas sucesivas de muerte celular programada, las cuales son responsables de la degradación de las masas proembriogénicas y la eliminación de los suspensores. Este tipo de evento celular suicida asegura el progreso normal de la embriogénesis somática, por ejemplo, la transición de las masas proembriogénicas a embriones somáticos con un correcto modelo de formación del embrión (von Arnold *et al.*, 2002). Salvando las diferencias, en los agregados celulares embriogénicos de guayabo pudiera estar sucediendo algo similar, lo cual se manifiesta en la falta de fluorescencia del tejido matricial bajo la luz UV.

En cuanto al rendimiento de la embriogénesis somática en medio líquido, se concluyó que los mejores resultados se obtuvieron con agregados celulares de tamaño intermedio de 250-1000 μm . En este rango se logró un proceso embriogénico de alta frecuencia con rendimientos de más de 90 embriones somáticos torpedo-cotiledonar por mililitro, con una calidad que se manifestó en un alto porcentaje de viabilidad. No obstante, el mejor modo de conocer la verdadera calidad del proceso de histodiferenciación llevado a cabo, sería a través de un estudio de la germinación y conversión en

planta, en especial al hacer una comparación con el método de histodiferenciación realizado en medio de cultivo semisólido.

4.2.4 Germinación y conversión en planta de los embriones somáticos.

4.2.4.1 Comparación de la germinación y conversión en planta de los embriones somáticos histodiferenciados en medio de cultivo líquido y semisólido.

En la tabla 19 se muestran los resultados del efecto del tipo de medio de cultivo (líquido o semisólido) utilizado para la histodiferenciación y desarrollo del embrión somático en etapa torpedo-cotiledonar, sobre la germinación *in vitro* y conversión en planta en condiciones *ex vitro*. En general se observó un efecto significativo en los resultados.

Los embriones somáticos, aislados y cosechados de uno y otro tipo de medio de cultivo, mostraron los primeros signos de germinación en medio semisólido MS 50% sin reguladores del crecimiento, a los 10 d. La germinación ocurrió mediante la emisión de una raíz principal y el desarrollo del hipocótilo y los cotiledones, hasta formar el brote caulinar (Figura 14a). De igual forma al experimento 4.2.3.1, se observaron diversas variantes de germinaciones consideradas fuera de tipo (Perán-Quesada *et al.*, 2004). En cuanto al porcentaje de germinación total no se mostraron diferencias significativas (Tabla 19). Sin embargo, con relación al porcentaje de germinación normal, los embriones histodiferenciados en el medio líquido superaron significativamente a los embriones desarrollados en medio semisólido.

De manera general, el proceso de germinación de los embriones somáticos de guayabo se ha señalado por otros autores. Akhtar *et al.* (2000) lograron altos porcentajes de germinación con el uso de un medio de cultivo MS (50% sales), con sacarosa 30.0 g.L⁻¹, solidificado con agar, pues señalaron que la germinación en igual medio, pero en estado líquido, no resultó positiva. La inclusión de reguladores del crecimiento, como citoquininas (BAP, Kin) y GA₃, en diferentes combinaciones, no mejoró el porcentaje de germinación (Akhtar *et al.*, 2000). Igualmente, para Chandra *et al.* (2004), la germinación resultó relativamente fácil e interesante, debido a que este proceso ocurrió en más del 85% de los embriones desarrollados y simultáneamente en el mismo medio de inducción del callo con estructuras embriogénicas.

Para otros autores, precisamente con el cultivar Enana Roja Cubana, esta fase del proceso mereció mayores esfuerzos y utilizaron un medio de cultivo MS (50% macroelementos), suplementado con BAP 0.25 mg.L⁻¹, sacarosa 20.0 g.L⁻¹ y Biobras-6 10.0 mg.L⁻¹ (Vilchez *et al.*, 2004). De este modo,

lograron un porcentaje de germinación del 83%, utilizando grupos de 20 embriones somáticos secundarios en etapa torpedo. Para los tratamientos con embriones somáticos secundarios que se colocaron de forma aislada, el porcentaje de germinación fue significativamente inferior ($\approx 60\%$).

Los resultados de germinación que se obtuvieron en este experimento (Tabla 19) se corresponden más con los alcanzados por los primeros autores. Las diferencias fundamentales encontradas en la literatura (Vilchez *et al.*, 2004), pudieran estar dadas en que estos autores no utilizan un medio de histodiferenciación apropiado, como ocurrió en este estudio con la combinación de ABA y sacarosa, la cual adicionalmente a su efecto favorable en la formación de los embriones somáticos también puede que contribuya a la maduración.

Por otro lado, la efectividad del medio de cultivo líquido durante la histodiferenciación se puso de manifiesto en la calidad del proceso de germinación, atendiendo a la variable de porcentaje de germinación normal (Tabla 19). Este medio de cultivo no solo permitió alcanzar altos rendimientos en el número de embriones somáticos por mililitro (Epígrafe 4.2.3.2), sino que además, mejoró la calidad de este proceso. En el guayabo, al igual que en muchas especies vegetales, el desarrollo del embrión tiene lugar embebido en un endospermo líquido dentro del saco embrionario. Durante el desarrollo, el endospermo se consume y el embrión crece hasta ocupar todo el volumen del saco embrionario antes de iniciar un proceso de deshidratación. Al parecer las condiciones artificiales de cultivo en medio líquido con altas concentraciones de sacarosa y ABA semejaron el estatus del endospermo natural y así lograron mejores resultados en la histodiferenciación de los embriones somáticos, que luego repercutieron en su capacidad de germinación.

Estudios más recientes, sobre la embriogénesis somática en el guayabo cv. Enana Roja Cubana, con el uso de sistemas de inmersión temporal en frascos RITA[®] y un medio de cultivo de composición similar al utilizado por Vilchez *et al.* (2004), pero en estado líquido, refieren porcentajes de germinación del 91.04%, significativamente superiores en comparación con el medio semisólido (81.79%) (Gómez-Kosky *et al.*, 2005). Adicionalmente, estos autores señalan un incremento en la masa fresca del cultivo y ningún daño por hiperhidricidad. Este aspecto resulta muy positivo, si se tienen en cuenta las experiencias desfavorables de germinación en medio líquido de otros autores (Akhtar *et al.*, 2000). El uso de este tipo de protocolo de germinación en sistemas de inmersión temporal, para los embriones histodiferenciados en medio de cultivo líquido en presencia de ABA y sacarosa, debe conducir a resultados superiores, si se tiene en cuenta que estos embriones, de tipo primario, de manera individual y en ausencia de reguladores del crecimiento, fueron capaces de

germinar en frecuencias similares a los embriones secundarios, en grupos y en medios de cultivos enriquecidos con BAP y Biobras-6 (Vilchez *et al.*, 2004).

Luego de 30 d de cultivo en condiciones de aclimatización, se observó un alto porcentaje de supervivencia en las plántulas provenientes de embriones somáticos histodiferenciados en ambos tipos de medios de cultivo (líquido y semisólido), sin diferencias estadísticas entre sí (Tabla 19). La aclimatización ocurrió satisfactoriamente y con una adecuada apariencia morfológica (Figura 14b). A los 30 d del trasplante a bolsas en condiciones de vivero, las plántulas mostraron un crecimiento normal sin malformaciones visibles a simple vista (Figura 14c). El porcentaje de conversión que se alcanzó con los embriones somáticos histodiferenciados en condiciones de medio de cultivo líquido fue significativamente superior al que se logró con embriones desarrollados en medio de cultivo semisólido (Tabla 19). Una vez más el medio líquido superó al medio semisólido, en especial desde el punto de vista de la calidad del proceso.

Esa superioridad cualitativa de los explantes histodiferenciados en medio líquido, se evidenció en el porcentaje de conversión en planta, y está asociada a la posibilidad que brinda el medio líquido de poner en contacto directo todas las superficies de los agregados celulares y embriones somáticos aislados o en grupos, con los componentes del medio de cultivo y en especial con los reguladores del crecimiento. Por el contrario en el medio de cultivo semisólido se crea un gradiente en el ascenso de los compuestos desde la base del explante hasta su parte superior, limitándose así la incidencia de los reguladores del crecimiento.

La información que existe sobre la fase de aclimatización de las plántulas de guayabo obtenidas por embriogénesis somática, es muy escasa. En solo dos artículos se hace referencia a la supervivencia durante la aclimatización. En el primero, Akhtar *et al.* (2000), refieren que el traspaso de las plántulas a condiciones *ex vitro* requirió el uso de sustratos estériles, debido al daño por contaminaciones fúngicas. Plantean además que fue necesaria una alta porosidad en la mezcla de arena, suelo de jardín y compost, para lo cual utilizaron proporciones de 5:1:2 (v/v), que le permitieron alcanzar porcentajes de supervivencia cercanos al 100%. Estos resultados concuerdan con los alcanzados en este experimento, en el guayabo 'Enana Roja Cubana' y confirman la importancia del uso de la zeolita 100% como sustrato inicial, por sus características de porosidad, estabilidad e higiene.

En el segundo trabajo, por el contrario, los resultados fueron menos satisfactorios y solo alcanzaron un 47.5% de supervivencia, luego de 45 d de cultivo en bandejas de poliuretano de 247 cavidades, con una mezcla de zeolita 15% y humus de lombriz 85% (v/v) (Vilchez *et al.*, 2004). Con relación a

este estudio los resultados que se obtuvieron en este experimento (Tabla 19) fueron superiores. Estas diferencias en la supervivencia pueden estar influenciadas por las condiciones de aclimatación y en especial por la porosidad del sustrato.

Con relación a la conversión en planta, en ninguno de los dos trabajos se brinda información al respecto, al parecer porque asumen los datos de supervivencia. Los resultados obtenidos en este experimento, demuestran que la conversión está relacionada con la supervivencia en aclimatación, pero a diferencia de ésta, refiere los valores al número inicial de embriones somáticos colocados en la fase de germinación, identificando la cantidad de éstos que llegan a convertirse en plántulas en condiciones *ex vitro*. Mientras, la supervivencia hace referencia al número inicial de plántulas colocadas al inicio de la aclimatación, identificando la cantidad de plantas que sobreviven a las nuevas condiciones ambientales. Ambas variables coinciden solo, cuando los embriones somáticos son colocados a germinar bajo condiciones de aclimatación *ex vitro*, como parte de sistemas de semilla artificial (Tapia *et al.*, 1999; Mamiya y Sakamoto, 2001). Por esa razón, en este experimento se calcula con exactitud el porcentaje de conversión en planta de los embriones somáticos de guayabo.

En general se concluye que el uso de medio de cultivo líquido durante la fase de histodiferenciación, favorece significativamente la calidad de los embriones somáticos, expresada en la superioridad de estos embriones en el porcentaje de germinación normal y conversión en planta.

4.2.5 Estudio histológico del proceso de embriogénesis somática en el guayabo.

Un acercamiento histológico a la embriogénesis somática *in vitro* del guayabo, cv. Enana Roja Cubana, permite una mayor comprensión del proceso y a la vez un mejor control del mismo. En la figura 15a-j, se observa una secuencia de imágenes que reflejan los aspectos más relevantes de dicho proceso.

La formación de un callo primario, de características nodulares, compacto y originado a partir de los tejidos epidérmicos y sub-epidérmicos del embrión cigótico inmaduro se hizo evidente en los cortes histológicos realizados a los explantes iniciales luego de las primeras dos semanas de iniciado el cultivo en la fase de inducción (Figura 15a). Durante los subcultivos de proliferación, posterior al crecimiento del callo nodular compacto, se observó el crecimiento de un tejido con estructuras embriogénicas nodulares de características muy friables (Figura 15b). Como parte de este nuevo tejido se observaron células de tamaño pequeño (10-20 μm), isodimétricas, con citoplasma denso, núcleo grande, caracterizado por una fuerte tinción que indicó altos contenidos de material proteico, que de acuerdo con Michaux-Ferrière *et al.* (1992), se trata de nucleoproteínas producto de la

elevada tasa de división celular que existe. Esas características citológicas del callo con estructuras embriónicas de guayabo, coinciden con las de otras especies *Myrtaceae* como la *Feijoa sellowiana* Berg. (Canhoto *et al.*, 1996; Dal Vesco, 1998) y el *Myrtus communis* L. (Canhoto *et al.*, 1999). Esta caracterización es importante pues permite asociar el potencial morfogenético del tejido con determinadas condiciones de cultivo en estudio, tal y como ocurrió en el caso del *Eucalyptus urophylla* en relación con el efecto del calcio en el medio de cultivo (Arruda *et al.*, 2000).

Estos tejidos demostraron que poseen un potencial embriónico favorable, pues se observó como algunas células en las capas de la periferia comenzaron a producir divisiones celulares anticlinales, periclinales y oblicuas para dar lugar a la formación de estructuras pro-embriónicas con una organización evidentemente polarizada (Figura 15c). Estos embriones en etapas muy iniciales, constituidos aún por pocas células, se encontraban unidos al tejido matriz a través de estructuras semejantes a suspensores con una sola hilera de células, lo cual definió un origen unicelular del embrión. No obstante, en otros casos esas estructuras se observaron constituidas por múltiples hileras de células (Figura 15d), lo cual demostró la existencia también de un origen multicelular en la formación del embrión somático de guayabo. En la mayoría de los casos los tejidos del suspensor no se observaron bien definidos pues se enmascaraban dentro de tejidos nodrizas o matriciales que persistieron en los embriones somáticos durante su desarrollo (Figura 15e). El origen unicelular de los embriones somáticos es generalmente asociado a procesos de embriogénesis somática directa, mientras que un origen celular variado se asocia frecuentemente a una embriogénesis somática indirecta (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002), lo cual concuerda con los resultados del guayabo.

El subsiguiente desarrollo de los embriones somáticos de guayabo se produjo de manera continua y asincrónica en el medio de histodiferenciación (Figura 15e y 15f), hasta alcanzar las etapas más avanzadas (Figura 15g). Durante todo el proceso de muestreo se observaron seis etapas de desarrollo bien definidas que se denominaron: globular, oblongo, corazón, torpedo, torpedo-elongado y cotiledonar. Las más frecuentes fueron las etapas, globular y oblongo. No obstante, grados intermedios como el torpedo-elongado también fueron frecuentes. Precisamente en esta etapa del embrión es que comenzaron a hacerse visibles por primera vez tejidos más diferenciados como la protodermis y el procambium en un incipiente tejido vascular (Figura 15f). Este es un hecho sobresaliente en la embriogénesis somática del guayabo, ya que para otras especies de la familia *Myrtaceae*, estos tejidos se hicieron visibles en etapas de desarrollo anteriores (Canhoto y Cruz, 1996). De igual forma ocurrió en otras especies como *Coffea arabica* L., donde estos tejidos se definieron perfectamente a partir de etapas de desarrollo globular y oblongo. Sin embargo sus células

fueron de menor tamaño (longitud) que aquellas presentes en los mismos tejidos de embriones en etapas torpedo-elongado y cotiledonar (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002). Este hecho en el guayabo pudiera estar restringido por las condiciones de cultivo o simplemente por condiciones genéticas propias de la especie. Estudios histológicos comparativos entre los procesos de embriogénesis cigótica que ocurre en las semillas y la embriogénesis somática *in vitro* son apropiados en este sentido (Kärkönen *et al.*, 2000).

De acuerdo con Dal Vesco (1998), el embrión somático de *Feijoa sellowiana* Berg., transita por seis etapas de desarrollo denominados: globular, cordiforme, torpedo-precoz, torpedo, pre-cotiledonar y cotiledonar. Este autor no reconoce la existencia de una etapa de embrión oblongo de transición. Sin embargo, se acepta que esta forma del embrión se produce debido a que el eje embrional sufre una considerable elongación antes de la emergencia de los cotiledones (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002). En el caso de la *Feijoa sellowiana* Berg., es posible que los embriones somáticos de forma oblonga (que sí fueron distinguidos en este estudio para el guayabo) se hayan enmascarado dentro de los embriones clasificados como globulares y cordiformes. De igual forma las etapas torpedo y pre-cotiledonar sugeridos por Dal Vesco (1998), pueden quedar agrupados como equivalentes dentro del conjunto nombrado torpedo-elongado que se propone en este estudio para el guayabo. Precisamente, la foto de un embrión somático en etapa torpedo-elongado se puede observar en la figura 11a, descrita previamente en el epígrafe 4.2.3.1, el cual fue inicialmente denominado y cuantificado como torpedo pues visualmente no fue posible distinguir las etapas intermedias de desarrollo. Este tipo de embrión somático guarda similitud morfológica con estructuras embriogénicas que aparecen en *Hevea brasiliensis* denominadas “forma de pera” (Michaux-Ferrière *et al.*, 1992), lo cual refleja que se trata de una etapa de desarrollo característica en la embriogénesis somática de especies angiospermas dicotiledóneas leñosas.

El desarrollo de los embriones somáticos continuó hasta alcanzar un estado de completa madurez morfológica y anatómica. Los embriones somáticos maduros de guayabo mostraron un desarrollo completo que se caracterizó por una adecuada definición de ambos polos del eje embrional, con cotiledones bien desarrollados y tejidos protodérmicos y procambiales bien definidos (Figura 15g). En el desarrollo y maduración de los embriones somáticos también se apreció la conformación del ápice caulinar con la formación del domo meristemático y los primordios foliares (Figura 15h). Este fenómeno sólo se observó en los embriones somáticos de mayor tamaño y desarrollo.

Durante el cultivo *in vitro* de las masas de tejido con estructuras embriónicas en medio líquido se observó con frecuencia la formación de grupos o agregados de embriones, los cuales se describieron morfológicamente en el experimento 4.2.3.2. El estudio histológico de estas estructuras (Figura 15i) demostró que el origen de tal conformación está dado por las potencialidades morfogenéticas que posee el tejido central o matriz. Al parecer este tejido matricial cumple tres funciones: primero dar origen a los embriones, segundo cooperar en su desarrollo y por último mantenerlos unidos incluso en etapas de desarrollo avanzado (Figura 15j).

Estructuras, morfológicamente similares a las descritas para el guayabo en este estudio, se observaron en el sistema de embriogénesis somática *in vitro* en medio líquido descrito para la zanahoria (Halperin, 1995). De acuerdo con este autor, en el modelo de embriogénesis somática basado en un ciclo auxínico en *Daucus carota* L., los grupos o agregados de embriones son el resultado de una diferenciación polarizada en los agregados celulares de las masas pro-embriónicas. En estos agregados, las capas de células más internas son citológica y metabólicamente diferentes a las capas de células más externas. Las células internas no utilizan sus reservas de almidón y no sintetizan ADN, como ocurre con las células externas que se dividen rápidamente para producir embriones globulares. De esta forma los embriones somáticos se originan en las capas superficiales del agregado celular y el polo radicular del embrión siempre queda orientado hacia éste, dando la conformación radial tridimensional del grupo. Este patrón de desarrollo pudiera ser también válido para los grupos de embriones en el guayabo.

Halperin (1995), también señaló que las células que componen el tejido matricial, semejante a un suspensor, son metabólicamente inertes. Este aspecto fue comprobado para el caso del guayabo mediante el examen de viabilidad con FDA realizado en el experimento del epígrafe 4.2.3.2. Sin embargo, en la figura 15j, se observó la formación de embriones globulares secundarios que surgen a partir de estos tejidos en la base de los embriones en etapas muy avanzadas, e incluso en la fase de germinación del embrión primario. Este fenómeno fue muy frecuente durante todo el estudio, por tanto no se comparte totalmente la idea de suspensores inertes planteada por Halperin (1995). De hecho, a partir de este estudio se asume, que ciertas células en la matriz permanecieron viables y en estados meristemáticos por períodos relativamente mayores, pese a que gran parte de este tejido pudo resultar muerto.

En otras especies angiospermas leñosas, los procesos de embriogénesis somática secundaria o recurrente estuvieron asociados a tejidos del eje embrional (Benelli *et al.*, 2001; Zegzouti *et al.*,

2001) o con mayor frecuencia a los cotiledones del embrión primario (Canhoto y Cruz, 1996; Canhoto *et al.*, 1999; Parra y Amo-Marco, 1999). En algunos casos excepcionales, como en la embriogénesis somática recurrente de alfalfa en medio libre de auxina, se informó la formación de nuevos embriones somáticos a lo largo de todo el embrión somático primario, desde el ápice radicular hasta justo debajo del meristemo apical y una mayor cantidad hacia la región del hipocótilo (Parrott y Bailey, 1993). Sin embargo, para el guayabo el proceso embriogénico recurrente o secundario tuvo características diferentes. De acuerdo con estos resultados, éste se caracterizó por la persistencia de un tejido nodriza que acompañó al embrión somático durante sus seis etapas de desarrollo y que bajo condiciones favorables suele dar lugar a nuevos embriones somáticos. Esta última característica beneficia el proceso regenerativo y de propagación *in vitro* pues este tipo de tejido pudiera ser utilizado para la perpetuación del cultivo.

Los trabajos anteriores relacionados con la embriogénesis somática *in vitro* del guayabo (Akhtar *et al.*, 2000; Vilchez *et al.*, 2002, 2004; Chandra *et al.*, 2004; Gómez-Kosky *et al.*, 2005) no demuestran histológicamente las etapas de desarrollo del embrión, ni las características anatómicas y citológicas de los callos con estructuras embriogénicas, ni su origen, como ha sucedido en otras especies *Myrtaceae*, como la *Feijoa seillowiana* Berg., (Canhoto y Cruz, 1996; Canhoto *et al.*, 1996; Guerra *et al.*, 1997; Guerra *et al.*, 2001; Cangahuala-Inocente *et al.*, 2004), el *Myrtus communis* L. (Canhoto *et al.*, 1999) y el *Eucalyptus urophylla* (Arruda *et al.*, 2000).

De manera general y a modo de consideraciones finales en esta parte del trabajo, se puede plantear que se logró implementar un protocolo de embriogénesis somática *in vitro* en el guayabo, que se destaca de los trabajos anteriores, en relación con el porcentaje de conversión en planta que mostró valores del 75%. Este nivel de respuesta en la aclimatización se relacionó con condiciones adecuadas de reguladores del crecimiento (ABA y sacarosa) y un uso efectivo del cribado y el medio líquido, en la fase de histodiferenciación de los embriones somáticos, que permitieron además alcanzar rendimientos de más de 90 embriones somáticos torpedo-cotiledonar por mililitro. Adicionalmente con el estudio histológico de la embriogénesis somática del guayabo, presentado en esta tesis, se resumió un importante segmento de información, necesario para comprender el desarrollo de este proceso en esta especie. Este tipo de investigación no existe en los estudios de embriogénesis somática *in vitro* del guayabo presentados con anterioridad. Además, en él se añaden aspectos interesantes sobre el patrón o modelo morfogénico que sostiene la formación de estructuras en forma de grupos o agregados de embriones somáticos, cuya descripción anato-morfológica se realiza en muy pocas especies.

5. CONCLUSIONES

1. Se estableció un protocolo de organogénesis *in vitro* en el guayabo con el uso de yemas de brotes de la raíz de árboles de campo, las cuales mostraron el menor contenido de compuestos fenólicos totales y permitieron alcanzar los mejores resultados en el establecimiento *in vitro*.
2. Las fases de multiplicación por segmentos nodales y ramificación axilar, así como el enraizamiento *in vitro* con una adecuada conexión vascular tallo-raíz y la aclimatización *ex vitro* de los brotes enraizados, permitieron obtener resultados favorables en la propagación.
3. Las plantas procedentes de la propagación *in vitro* no manifestaron variaciones fenotípicas significativas en comparación con las plantas procedentes de estacas enraizadas, en cuanto a características fenológicas de crecimiento del árbol y bromatológicas del fruto. En relación con las variables reproductivas, durante el primer año de plantadas, las vitroplantas mostraron un retraso de 10-12 meses y el rendimiento promedio por árbol fue significativamente inferior.
4. Se implementó un procedimiento de embriogénesis somática en el guayabo, que contempla la inducción y proliferación del tejido o callo con estructuras embriogénicas a partir de embriones cigóticos inmaduros extraídos de frutos de 45 d de edad, y donde el proceso de histodiferenciación de los embriones somáticos mejoró significativamente en presencia de sacarosa 60.0 g.L^{-1} y ABA $15.0\text{-}20.0 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$.
5. El uso del medio líquido y el cribado de las suspensiones celulares heterogéneas en tamices de $250\text{-}1000 \text{ }\mu\text{m}$ permitió alcanzar niveles de histodiferenciación superiores a 90 embriones somáticos torpedo-cotiledonar por mililitro, con una viabilidad superior al 95%, que promovió la germinación *in vitro* normal y promovió un porcentaje de conversión en planta del 75.5%.

6. RECOMENDACIONES

1. Continuar utilizando en el Centro de Bioplasmas e introducir en otras entidades especializadas, las vías morfogénicas de organogénesis a partir de yemas de plantas de campo y de embriogénesis somática *in vitro*, como alternativas para la propagación y conservación del germoplasma de guayabo cv. Enana Roja Cubana, así como para el desarrollo de programas de mejoramiento genético en esta especie.
2. Realizar un estudio de estabilidad genética con el uso de marcadores moleculares para complementar los resultados de estabilidad fenotípica obtenidos en este trabajo.
3. Realizar estudios relacionados con el cultivo de suspensiones celulares finas, para evaluar la capacidad de ese sistema de cultivo en el desarrollo de la embriogénesis somática *in vitro* del guayabo.

Abreviaturas

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

ABA: ácido absícico

AIA: ácido indol-3-acético.

AIB: ácido indol-3-butírico.

ANA: ácido naftalenacético.

B5: medio de cultivo, formulación de Gamborg *et al.* (1960).

BAP o BA: 6-bencilaminopurina o N⁶-benciladenina.

GA₃: ácido giberélico.

Kin: Kinetina

LPm: medio de cultivo, formulación de von Arnold y Eriksson (1981).

m/v: relación masa:volumen

MS: medio de cultivo, formulación Murashige y Skoog (1962).

OM: medio de cultivo, formulación *Rugini Olive Medium*, de Rugini (1984).

Picloram: ácido 4-amino-3,5,6 tricloropicolínico.

PVPP: Polivinilpolipirrolidona.

TDZ: Thidiazuron

UV: ultravioleta

v/v: relación volumen:volumen

WPM: medio de cultivo, formulación *Woody Plant Medium*, de Lloyd y Mc Cown (1980).

Principales unidades de medidas (Mazola, 1991)

L	litro	mg.L ⁻¹	miligramo por litro
mL	mililitro	g.L ⁻¹	gramo por litro
μL	microlitro	mg.g ⁻¹	miligramo por gramo
m	metro	mol.L ⁻¹	mole por litro
cm	centímetro	μmol.L ⁻¹	micromole por litro
μm	micrómetro	μmol.m ⁻² .s ⁻¹	micromole por metro cuadrado por segundo
nm	nanómetro	°C	grados centígrados
g	gramo	s	segundo solar medio
mg	miligramo	min	minuto solar medio
kg	kilogramo	h	hora solar media
W	watt	d	día solar medio

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelrahim, S.I.; Almadboul, A.Z.; Omer, M.E.A.; Elegami, A. 2002. Antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. *Fitoterapia*, 73(7-8):713–715.
- Acosta, M.; Caballero, I.; Alvarado, Y.; Leiva, M. 2002. Micobiota epifítica y contaminantes fungosos del establecimiento *in vitro* de la guayaba (*Psidium guajava* L.). *Biocología Vegetal*, 2(2): 67-71.
- Agarwal, S.; Kanwar, K.; Sharma, D.R. 2004. Factors affecting secondary somatic embryogenesis and embryo maturation in *Morus alba* L. *Scientia Horticulturae*, 102: 359-368.
- Aguilera, R. 2001. *Psidium guajava* L. (en línea). Disponible en: http://www.conafor.gob.mx/programas_nacionalesforestales/pronare/Fichas%20Técnicas/P.%20guajava.pdf. Visitado: Noviembre 15, 2003.
- Akhtar, N.; Kumari, N.; Pandey, S.; Ara, H. ; Singh, M.; Jaiswal, U.; Jaiswal, V.S.; Jain, M. 2000. Somatic embryogenesis in tropical fruit trees. En: Jain, S.M.; Gupta, P.K.; Newton, R.J. (eds). *Somatic embryogenesis in woody plants*. vol. 6, pp. 93-140. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Ali, B.N.; Mulwa, R.M.S.; Norton, M.A.; Skirvin, R.M. 2003. Micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.). *J. Hort. Scien. Biotech.*, 78(5): 739-741.
- Alvelos, M.R.; Cruz, G.S.; Canhoto, J.M. 2000. Effect of abscisic acid on somatic embryo maturation in *Feijoa sellowiana* Berg (Myrtaceae). COST 843 “Quality enhancement of plant production through tissue culture”. Working Group 2-Advanced propagation techniques. Tampere, Finland. 7-10/Julio/2000.
- Amin, M. N.; Jaiswal, V. S. 1987. Rapid clonal propagation of guava through *in vitro* shoots proliferation on nodal explants of mature trees. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.*, 9: 235-244.
- Amin, M. N.; Jaiswal, V. S. 1988. Micropropagation as an aid to rapid cloning of a guava cultivar. *Scientia Hort.* 36: 89-95.
- Andreu, P.; Marín, J.A. 2005. *In vitro* culture establishment and multiplication of the *Prunus* rootstock ‘Adesoto 101’ (*P. insititia* L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. *Scientia Horticulturae*, 106 (2): 258-267.
- Anis, M.; Husain, M.K.; Shahzad, A. 2005. *In vitro* plantlet regeneration of *Pterocarpus marsupium* Roxb, an endangered leguminous tree. *Current Science*, 88 (6): 861-863.
- Antunes De Moraes, L.K.; Felisbino, C.; Crestani, L.; Lima Da Silva, A. 2004. *In vitro* establishment and multiplication of *Pyrus calleryana* d-6 on double-phase culture system. *Rev. Bras. Frutic.*, 26(3): 403-405.
- Araujo, F.J.; Quintero, S.; Salas, J.; Villalobos, J.; Casanova, A. 1997. Crecimiento y acumulación de nutrientes del fruto de Guayaba (*Psidium guajava* L.) del tipo "Criolla Roja" en la planicie de Maracaibo. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 14: 315-328.
- Araujo, F. J.; Urdaneta, T.; Salazar N.; Simancas. R. 1999. Efecto de la densidad de siembra sobre el rendimiento en guayabo (*Psidium guajava* L.) en la Planicie de Maracaibo, Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 16 Supl. 1: 13-16.
- Arezki, O.; Boxus, P.; Kevers, C.; Gaspar, T. 2001. Changes in peroxidase activity, and level of phenolic compounds during light-induced plantlet regeneration from *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. nodes *in vitro*. *Plant Growth Regulation*, 33: 215–219.
- Arruda, S.C.C.; Souza, G.M.; Almeida, M.; Gonçalves, A.N. 2000. Anatomical and biochemical characterization of the calcium effect on *Eucalyptus urophylla* callus morphogenesis *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 143–154.

- Baker, C.; Wetzstein, H. 1994. Influence of auxin type and concentration on peanut somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 36:273-277.
- Baptista, F.; Rojas, L.; Portillo, D.; Vilchez, J.; Martínez, L.; Marín, M.; Cassasa-Padrón, A.M.; González, C. 2006. Propagación por acodo aéreo de selecciones de guayabo (*Psidium guajava* L.) tolerantes a *Meloydogine incognita*. Memorias Congreso Nacional de Fruticultura, Barquisimeto, Venezuela. Octubre, 24-27, 2006. pp 166.
- Benelli, C.; Fabbri, A.; Grassi, S.; Lambardi, M.; Rugini, E. 2001. Histology of somatic embryogenesis in mature tissue of olive (*Olea europaea* L.). *J. Hort. Sci. Biotechnol.*, 76(1): 112-119.
- Bhatt, I.D.; Dhar, U. 2004. Factors controlling micropropagation of *Myrica esculenta* Buch.-Ham. Ex D.Don: a high value wild edible of Kumaun Himalaya. *African J. Biotechnology*, 3(19): 534-540.
- Blakesley, D. 1991. Uptake and metabolism of 6-benzyladenine in shoot cultures of *Musa* and *Rhododendron*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 25: 69-74.
- Blanc, G.; Michaux-Ferrière, N.; Teisson, C.; Lardet, L.; Carron, M.P. 1999. Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 59: 103-112.
- Breeuwer, P.; Drocourt, J.L.; Bunschoten, N.; Zwietering, M.H.; Rombouts, F.M.; Abee, T. 1995. Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4): 1614-1619.
- Caboni, E.; D'Angeli, D. Chiappetta, A.; Innocenti, A.M.; Van Onckelen, H.; Damiano, C. 2002. Adventitious shoot regeneration from vegetative shoot apices in pear and putative role of cytokinin accumulation in the morphogenetic process. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 70: 199-206.
- Cangahuala-Inocente, G.C.; Steiner, N.; Santos, M.; Guerra, M.P. 2004. Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. *Protoplasma*, 224(1-2):33-40.
- Canhoto, J. M.; Cruz, G. S. 1994. Improvement of somatic embryogenesis in *Feijoa sellowiana* Berg. (*Myrtaceae*) by manipulation of culture media composition. *In vitro Cell. Biol.-Plant*, 30: 21-25.
- Canhoto, J. M.; Cruz, G. S. 1996. Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg). *Protoplasma*, 191(1-2): 34-45.
- Canhoto, J. M.; Mesquita, J.F.; Cruz, G. S. 1996. Ultrastructural Changes in Cotyledons of Pineapple Guava (*Myrtaceae*) During Somatic Embryogenesis. *Annals of Botany*, 78: 513-521.
- Canhoto, J.M.; Lopes, M.L.; Cruz, G.S. 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (*Myrtaceae*). *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 57: 13-21.
- Cañizares, J. Z. 1968. El guayabo y otras Mirtáceas. Edición Revolucionaria. La Habana. Cuba. pp.87.
- Cantagallo, F.D.; De Azevedo, F.A.; Schinor, E.H.; Mourão Filho, F.A.; Januzzi Mendes, B.M. 2005. Micropropagation of 'swingle' citrumelo through axillary buds *in vitro* culture. *Rev. Bras. Frutic.*, 27(1): 136-138.
- Caraballo, B. M. 2001. Biología floral del guayabo (*Psidium guajava* L.) en la Planicie de Maracaibo Plateau, Zulia, Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 18: 41-55.
- Cardone, S.; Olmos, S.; Echenique, V. 2004. Variación somaclonal. En: Echenique, V.; Rubinstein, C.; Mroginski, L. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Ediciones INTA, 2004. Buenos Aires, Argentina. pp. 82-96.
- Cardoza, V.; D'Souza, L.D. 2002. Induction, development and germination of somatic embryos from nucellar tissues of cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Scientia Horticulturae*, 93: 367-372.

- Cassasa, A. M.; Matheus, J.; Crozzoli, R.; Bravo, V.; González, C. 1997. Respuesta de algunas selecciones de guayabo al nematodo *Meloidogyne incognita* en el municipio Mara del Estado Zulia, Venezuela. *Fitopatología Venezolana*, 10: 5-8.
- Celestino, C.; Hernández, I.; Carneros, E.; López-Vela, D. Toribio, M. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Invest Agrar: Sist Recur For.*, 14(3): 345-357.
- Cerda, F.; Aquea, F.; Gebauer, M.; Medina, C.; Arce-Johnson, P. 2002. Stable transformation of *Pinus radiata* embryogenic tissue by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 251–257.
- Chandra, R; Bajpai, A.; Gupta, S.; Tiwari, R.K. 2004. Embryogenesis and plant regeneration from mesocarp of *Psidium guajava* L. (guava). *Indian Journal of Biotechnology*, 3: 246-248.
- Changrun, L.; Chiang-Shiong, L.; Wendell, Q.S. 1999. An improved dehydration protocol for cryopreservation of *Brassica napus* somatic embryos. *Cryo-Letters*, 20: 263-268.
- Chirinos-Torres, D; Marín-Larreal, M.; González-Palmar, C; Lara, C. 2006. Crecimiento y producción de plantas de guayabo (*Psidium guajava* L.) bajo riego e incidencia de frutos enfermos. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 23: 58-66
- Collado, R.; Agramonte, D.; Pérez-Ponce, J.N.; Pérez, M.; Gutiérrez, O.; Jiménez, F.; Ramírez, D. 2002. Selección de líneas clonales de guayaba del cultivar Enana Roja (EEA 18-40) para su uso en el mejoramiento genético y propagación. *Biotecnología Vegetal*, 2(4): 207-210.
- Cosgrove, D.J. 2000. Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol. Biochem.* 38 (1/2): 109-124.
- Cruz, G.S.; Canhoto, J.M.; Abreu, M.A.V. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. *Plant Science*, 66(2): 263- 270.
- D'Onofrio, C. Morini, S.; Bellocchi, G. 1998. Effect of light quality on somatic embryogenesis of quince leaves. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 53(2): 91-98.
- Dal Vesco, L. 1998. Indução e controle da embriogênese somática *in vitro* na goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.). Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil. p. 82.
- Dal Vesco, L.L.; Guerra, M.P. 2001. The effectiveness of nitrogen sources in *Feijoa* somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 64:19-25.
- De Klerk, G.J.; Van der Krieken, W.; De Jong, J.C. 1999. Review the formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In vitro Cell. Biol.-Plant*, 35: 189-199.
- Devarumath., R.M.; Nandy, S.; Rani, V.; Marimuthu, S.; Muraleedharan, N.; Raina, S.N. 2002. RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing *Camellia sinensis* (China type) and *C. assamica ssp. assamica* (Assam-India type). *Plant Cell Reports*, 21:166–173.
- Dodeman, V. L.; Ducreux, G.; Kreis, M. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embriogénesis. *J. Exp. Bot.*, 48: 1493-1509.
- Dustan, D.I; Tautorus, T.E.; Thorpe, T.A. 1995. Somatic embryogenesis in woody plants. En: Thorpe, T.A. (ed.) *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands. pp. 471-538.
- Estrada-Luna, A. A.; Davies Jr., F.T.; Egilla, J.N. 2000. Mycorrhizal fungi enhancement of growth and gas exchange of micropropagated guava plantlets (*Psidium guajava* L.) during ex vitro acclimatization and plant establishment. *Mycorrhiza*, 10: 1-8.

- Etienne, H.; Sotta, B.; Montoro, P.; Miginiac, E.; Carron, M.P. 1993. Comparison of endogenous ABA and IAA contents in somatic and zygotic embryos of *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.) during ontogenesis. *Plant Science*, 92 (1): 111-119.
- FAO, 2005. Committee on Commodity Problems. Intergovernmental group on bananas and tropical fruits. Fourth Session. Guayaquil, Ecuador, 19 – 23 September 2005. Market profile on tropical fruits in India. (en línea). Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/meeting/009/j5642e.htm>. Visitado en Mayo del 2006.
- FAOSTAT, 2006. FAO Statistic Division 2006. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/340/default.aspx>. (en línea). Visitado en: Julio/2006.
- Farrés, E.; Peña, O. 2001. Propagación de la guayaba. *Revista RELAFRUT.*, Carta Circular No. 4: 3-4.
- Fehér, A.; T.P. Pasternak; D. Dudits. 2003. Transition of somatic plant cell to an embryogenic state. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 74: 201-228.
- Fernández-Lorenzo, J.L.; Rigueiro, A.; Ballester, A. 1999. Polyphenols as potential markers to differentiate juvenile and mature chestnut shoot cultures. *Tree Physiology*, 19: 461-466.
- Filonova, L.; Bozhkov, P.; Brokhin, V.; Daniel, G.; Zhivotovsky, B.; von Arnold, S. 2000. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *J. Cell Sci.*, 113: 4399-4411.
- Finkelstein, R.R.; Somerville, C. 1989. Abscisic acid or high osmoticum promote accumulation of long-chain fatty acids in developing embryos of *Brassica napus*. *Plant Sci.*, 61: 213-217.
- Fisichella, M.; Silvi, E.; Moroni, S. 2000. Regeneration of somatic embryos and roots from quince leaves cultured on media with different macroelement composition. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 63: 101-107.
- Fraga, M.F.; Cañal, M.J.; Rodríguez, R. 2002. *In vitro* morphogenic potential of differently aged *Pinus radiata* trees correlates with polyamines and DNA methylation levels. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 139-145.
- Gaj, M.D. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*, 43: 27-47.
- Gamborg, O.L.; Miller, R.A.; Ojima, K. 1960. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean roots cells. *Exp. Cell Res.* 50: 15-18.
- García, J.; N. Avidan, A. Troncoso, R. Sarmiento, S. Lavee. 2000. Possible juvenile-related proteins in olive tree tissues. *Scientia Horticulturae*, 85: 271-284.
- García-Martín, G.; Manzanera J.A.; González-Benito, M.E. 2005. Effect of exogenous ABA on embryo maturation and quantification of endogenous levels of ABA and IAA in *Quercus suber* somatic embryos. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 80: 171-177.
- García, W.; Trujillo, R; Concepción, O. 2004. Estudio fenológico de líneas obtenidas a partir de la autopolinización y micropropagación de la guayaba var. Enana Roja Cubana EEA 18-40. Trabajo de Diploma. Departamento de Producción Agropecuaria. Facultad de Agronomía. Universidad de Ciego de Avila. pp. 1-48.
- Garin, E.; Bernier-Cardou, M.; Isabel, N.; Klimaszewska, K.; Plourde, A. 2000. Effect of sugars, amino acids, and culture technique on maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* on medium with two gellan gum concentrations. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 62: 27-37.
- Gaspar, T.; Kevers, C.; Penel, C.; Greppin, H.; Reid, D.M.; Thorpe, T.A. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 32: 272-289.

- Gaspar, T.; Kevers, C.; Faivre-Rampant, O.; Crèvecoeur, M.; Penel, C.; Greppin, H.; Dommès, J. 2003. Changing concepts in plant hormone action. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 39: 85–105.
- Gentile, A.; Monticelli, S.; Damiano, C. 2002. Adventitious shoot regeneration in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Plant Cell Reports*, 20 (11): 1011 – 1016.
- George, E. F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Ltd. 524p.
- Gómez-Kosky, R.; Vilchez, J.; Albany, N.; Agramante, D. 2005. Somatic embryo germination of *Psidium guajava* L. in the Rita® temporary immersion system and on semisolid medium. En: Hvoslef-Eide, A.K.; Preil, W. (eds.) *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. Springer, Dordrecht, Netherlands. pp. 225-229.
- González, G.; Fuentes, V.; Rodríguez, N. N.; Torres, M.; Capote, M.; Cañizares, J.; Lima, H.; Orozco, P. 1996. Colecciones y recursos fitogenéticos en la Estación Nacional de Frutales de Cuba. *Revista del Jardín Botánico Nacional*, 16 - 17:123-134.
- González, G.; Sourd, D. 1985. Efecto de la poda manual en cinco cultivares de guayabo. *Agrotécnica de Cuba*, 17(1): 1-8.
- González, G.; Sourd, D.; Lima, H. 1985. Estudios físico - químicos en frutos de 10 cultivares de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Cítricos y otros Frutales*, 8(4): 47 - 56.
- González, M.E.; Ramos, R.; Santana, N. 2000. Efecto del ácido abscísico (ABA) en la regulación del desarrollo de embriones somáticos de *Coffea canephora* P. var. Robusta. *Cultivos Tropicales*, 21(3): 33-37.
- Groll, J.; Mycock, D.J.; Gray, V.M.; Laminski, S. 2001. Secondary somatic embryogenesis of cassava on picloram supplemented media. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 65: 201-210.
- Guerra, M.P.; Pescador, R.; Dal Vesco, L.L.; Ducroquet, J.P.H.J.; Nodari, R.O.; Dos Reis, M. 2001. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, 13(2):117-128.
- Guerra, M.P.; Pescador, R.; Dal Vesco, L.L.; Nodari, R.O.; Ducroquet, J.P.H.J. 1997. *In vitro* morphogenesis in *Feijoa sellowiana*: Somatic embryogenesis and plant regeneration. *Acta Horticulture*, 452: 27-36.
- Guerrero, J.; Trujillo, R; Concepción, O. 2004. Caracterización fenológica de germoplasma de guayaba obtenido a partir de la polinización libre de la variedad Enana Roja Cubana EEA 18-40. Trabajo de Diploma. Departamento de Producción Agropecuaria. Facultad de Agronomía. Universidad de Ciego de Avila. pp. 1-46.
- Gurr, S.I.; Mc Pherson, M.I.; Bowles, D.J. 1992. Lignin and associated phenolic acids in cell walls. *Molecular Plant Pathology and Practical Approach*, 3: 162-175.
- Gutiérrez, I.Y.; Gaitén, M.M.; Martínez, O.B.; Naranjo, J.; Rodríguez, L. 2000. Suspensión oral antidiarreico de *Psidium guajava* L. *Revista Cubana Farm.*, 34(1): 9-44.
- Hajari, E.; Watt, M.P.; Mycock, D.J.; McAlister, B. 2005. Plant regeneration from induced callus of improved *Eucalyptus* clones. *South African J. Bot.*, 72: 195-201.
- Halperin, W. 1995. *In vitro* embryogenesis: some historical issues and unresolved problems. En: Thorpe, T.A. (ed.) *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands. pp. 155-203.
- Hartmann, H.T.; Kester, D.E.; Davies, F.T. 1992. *Plant propagation. Principles and practices*. Fifth Edition. Prentice-Hall. New Jersey, USA. p. 256-303.

- Hernández, I.; Celestino, C.; Toribio, M. 2003. Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis I. Factors affecting the induction in leaves from mature cork oak trees. *Plant Cell Reports*, 21: 759-764.
- Hernández, J.A.; Ascanio, G.M.O.; Morales, M.D. 1999. Nueva versión de clasificación genética de los suelos. MINAG. Cuba. Universidad de Veracruz, Facultad de Biología Agropecuaria. p. 14.
- Hoangland, R. 1990. *Alternaria cassiae* alters phenylpropanoid metabolism in Sicklepod (*Cassia obtusifolia*). *Phytopathology* 130: 177-187.
- Ibaraki, Y.; Matsushima, R.; Kurata, K. 2000. Analysis of morphological changes in carrot somatic embryogenesis by serial observation. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 61: 9-14.
- Jaiarj, P.; Khoohaswan, P.; WongKrajang, Y.; Peungvichia, P.; Suriyawong, P.; Saraya, M.L.; Ruangsomboon, O. 1999. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. leaf extract. *J. Ethnopharmacol*, 67(2): 203-212.
- Jaiswal, V. S.; Amin, M. N. 1987. *In vitro* propagation of guava from shoot culture of mature trees. *Plant Physiol.*, 130: 7-12.
- Jiménez, V.M. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 47: 91-110.
- Jiménez-Escrig, A.; Rincon, M.; Pulido, R.; Saura-Calixto, F. 2001. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *J. Agric. Food Chem.*, 49(11): 5489-5493.
- Johansen, D.J. 1940. *Plant microtechnique*. Mc Graw-Hill, New-York. p. 146.
- Joyce, S.M.; Cassells, A.C. 2002. Variation in potato microplant morphology *in vitro* and DNA methylation. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 70: 125-137.
- Kaeppler, S.; Kaeppler, H.; Rhee, Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology*, 43: 179-188.
- Kärkönen, A. 2000. Anatomical study of zygotic and somatic embryos of *Tilia cordata*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 61: 205-214,
- Kefeli, V.I.; Kalevitch, M.V.; Borsari, B. 2003. Phenolic cycle in plants and environment. *J. of Cell and Mol. Biol.*, 2: 13-18.
- Keller, E.R.J.; Senula, A.; Leunufna, S.; Grübe, M. 2006. Slow growth storage and cryopreservation—tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *International Journal of Refrigeration*, 29(3): 411-417.
- Khattak, M.S.; Malik, M.N.; Khan, M.A. 1990. Effect of surface sterilization agents on *in vitro* culture of guava (*Psidium guajava* L.) cv. 'Sufeda' tissue. *J. of Agric.*, 6(2): 151-154.
- Khattak, M.S.; Malik, M.N.; Khan, M.A. 2001. Macro-propagation of Guava (*Psidium guajava* L.) *Journal of Biological Sciences*, 1(3): 111-112.
- Kim, Y.H.; Janick, J. 1991. Abscisic acid and proline improve desiccation tolerance and increase fatty acid content of celery somatic embryos. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 24: 83-89.
- Kim, Y.W.; Youn, Y.; Noh, E.R.; Kim, J.C. 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 55: 95-101.
- Klimaszewska, K.; Cyr, D.R. 2002. Conifer somatic embryogenesis: I. Development. *Dendrobiology*, 48: 31-39.

- Laguado, N.; Marín, M.; Arenas de Moreno, M.; Castro de R., C. 1998. Relación entre variables indicadoras de maduración de frutos de guayabo (*Psidium guajava* L.) var. Dominicana roja. Rev. Fac. Agron. (LUZ), 15: 422-428.
- Laguado, N.; Rendiles, E.; Marín, M.; Arenas de Moreno, M.; Castro de R., C. 1999a. Crecimiento de frutos de guayabo (*Psidium guajava* L.) del tipo criolla roja. Etapa I. Rev. Fac. Agron. (LUZ), 16 Supl. 1: 30-35.
- Laguado, N.; Pérez, E.; Alvarado, C.; Marín, M. 1999b. Características físicoquímicas y fisiológicas de frutos de guayaba de los tipos Criolla Roja y San Miguel procedentes de dos plantaciones comerciales. Rev. Fac. Agron. (LUZ), 16: 382-397.
- Laura, V.; Arango, W. 2001. Recursos Genéticos de Guayaba Fitomejoramiento. Disponible en: <http://www.corpoica.org.co/sitiocorpoica/planes/novedad/recguayaba.htm> Visitado: 25 de Enero de 2006.
- Larkin, P.; Scowcroft, W. 1981. Somaclonal variation - a novel source of variability from cells cultures from plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60, 197-214.
- Lee, K.S.; Lee, J.C.; Soh, W.Y. 2002. High frequency plant regeneration from *Aralia cordata* somatic embryos. Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 68: 241-246.
- Le Roux, J. J.; Van Staden, J. 1991. Micropropagation of tissue of Eucalyptus – a review. Tree Physiology, 9:433-477.
- León, S.; Arenas, L. y Vilorio, Z. 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.
- Li, X.; Krasnyanski, S.F.; Korban, S.S. 2002. Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in Rosa. J. Plant Physiol, 159: 313-319.
- Li, Z.; Traore, A.; Maximova, S.; Guiltinan, M.J. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. *In vitro* Cell Dev. Biol.-Plant, 34: 293-299.
- List, S.E.; Brown, P. H.; Low, C. S.; Walsh, K. B. 1996. A micropropagation protocol for *Melaleuca alternifolia* (tea tree). Aus. J. of Exper. Agric. 36: 755-760.
- Litz, R.E. 1984a. *In vitro* responses of adventitious embryos of two polyembryonic *Eugenia* species. HortScience, 19(5): 720-722.
- Litz, R.E. 1984b. *In vitro* somatic embryogenesis from callus of jaboticaba, *Myrciaria cauliflora*. HortScience, 19(1): 62-64.
- Litz, R.E.; Hendrix, R.C.; Moon, P.A.; Chavez, V.M. 1998. Induction of embryonic mango cultures as affected by genotype, explanting, 2,4-D and embryonic nurse culture. Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 53: 13-18.
- Litz, R.E.; Jaiswal, V.S. 1991. Micropropagation of tropical and subtropical fruits. En: Deberg, P.C.; Zimmerman, RH (Eds.). Micropropagation. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 247-263.
- Liu, G.; Bao, M. 2003. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of London plane tree (*Platanus acerifolia* Willd.) Plant Cell Reports, 20 (7): 640-644.
- Lloyd, G.; McCown, B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Intern. Plant Prop Soc Proc 30: 421-427.
- Loh, C. S.; Rao, A. N. 1989. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from seedlings and grafted plants and adventitious shoot formation *in vitro*. Scientia Hortic., 39:31-39.

- López, J. 2006. Nueva metodología para el desarrollo de la embriogénesis somática en el cultivar de plátano vianda 'Navolean' (*Musa spp.*, grupo AAB). Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Ciego de Avila. Centro de Bioplantas. Ciego de Avila. p. 100.
- Lorenzo, J.C.; M.A. Blanco, O. Peláez, A. González, M. Cid, A. Iglesias, B. González, M. Escalona, P. Espinosa, C. Borroto. 2001. Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 65: 1-8.
- Loureiro, J.; Pinto, G.; Lopes, T.; Doležel, J.; Santos, C. 2005. Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry. *Planta*, 221: 815-822.
- Lozoya, X.; Reyes-Morales, H.; Chávez-Soto, M.A.; Martínez-García, M. del C.; Soto-González, Y.; Doubova, S.V. 2002. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. *J. Ethnopharmacol.*, 83(1-2): 19-24.
- Lozoya-Saldaña, H. 2001. Phytosanitary and Quarantine Considerations in the International Exchange of Plant Germplasm. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19: 230-236.
- Mamiya, K; Sakamoto, Y. 2001. A method to produce encapsulatable units for synthetic seeds in *Asparagus officinalis*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 64: 27-32.
- Mariano-Escandelay, L.H.; Leonel, S.; Michelle-Apponi, L. 2006. Agronomic characteristics of 'prata-anã' and 'maçã' bananas micropropagated. *Rev. Bras. Frutic.*, 28 (1): 148-150.
- Marinucci, L.; Ruscitti, M.; Abedini, W. 2004. Morfogénesis *in vitro* de leguminosas forestales nativas de la República Argentina. *Rev. Fac. Agron. La Plata*, 105 (2): 27-36.
- Marks, T.R.; Ford, Y.-Y.; Cameron, R.W.F.; Goodwin, C.; Myers, P.E.; Judd, H.L. 2002. A role for polar auxin transport in rhizogenesis. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 70: 189-198.
- Martínez, M. 1998. Comportamiento fenológico del cultivo de la guayaba (*Psidium guajava* L.) en la región agroclimática de Ciego de Ávila. Trabajo de Diploma. Departamento de Producción Agropecuaria. Facultad de Agronomía. Universidad de Ciego de Ávila. pp. 35.
- Mauri, P.V.; Manzanera, J.A. 2003. Induction, maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex* L.) somatic embryos. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 00: 1-7.
- Mauri, P.V.; Manzanera, J.A. 2004. Effect of abscisic acid and stratification on somatic embryo maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex* L.). *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 40: 495-498.
- Mazola, N. 1991. Manual del Sistema Internacional de Unidades. Editorial Pueblo y Educación. Ciudad de la Habana, Cuba. p. 275.
- Mederos, V.R. 2006. Embriogénesis somática en yucca (*Manihot esculenta*, Crantz). Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Ciego de Avila. Centro de Bioplantas. Ciego de Avila. p. 100.
- McGuire, R. G.; Hallman, G.J. 1995. Coating Guavas with Cellulose- or Carnauba-based Emulsions Interferes with Postharvest Ripening. *HortScience*, 30(2): 294-295.
- Medina, M.L.; Pagano, F. 2003. Caracterización de la pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) tipo "Criolla Roja". *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 20: 72-86.
- Merkle, S.A.; Parrott, W.A.; Flinn, B.S. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe, T.A. (ed.) *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands. pp. 155-203.
- Michalczuk, L.; Cooke, T.J.; Cohen, J.D. 1992. Auxins levels of different stages of carrot somatic embryogenesis. *Phytochem.*, 31: 1097-1103.

- Michaux-Ferrière, N.; Grout, H.; Carron, M.P. 1992. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). *Amer. J. of Botany*, 79(2): 174-180.
- MINAG. 2004. Instructivo técnico del guayabo Enana Roja Cubana. Dirección de cítricos y otros frutales. Ministerio de la Agricultura. Ciudad de La Habana, Cuba. pp. 12.
- MINAG. 2006. Informe Estadístico Anual, Modelo 521. Ministerio de la Agricultura. Ciudad de La Habana. Cuba. pp 20.
- Mohamed-Yasseen, Y.; Barringer, S. A.; Schnell, R. J.; Splittstoesser, W. E. 1995. *In vitro* shoot proliferation of guava (*Psidium guajava* L.) from germinated seedlings. *Plant Cell Reports*, 14: 525-528.
- Morales, V.; Rodríguez, M. 2000. Descripción del sistema productivo de la guayaba en Venezuela. Disponible en: <http://www.pronatta.gov.co/retroalim/redes/Guayaba%20actividad.htm-34k>. Visitado: 15 de Enero de 2006.
- Murashige T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15: 473-479.
- Nápoles, D.; Trujillo, R; Concepción, O. 2004. Caracterización bromatológica de frutos de líneas obtenidas mediante la polinización libre y la micropropagación de la guayaba (*Psidium guajava* L.) EEA 18-40. Trabajo de Diploma. Departamento de Producción Agropecuaria. Facultad de Agronomía. Universidad de Ciego de Avila. p. 54.
- Nápoles, L. 2003. Propagación *in vitro* de la guayaba (*Psidium guajava* L.) var. Enana Roja Cubana EEA 18-40, a partir de yemas de campo. Tesis presentada en opción al grado científico de Master en Biotecnología Vegetal. Universidad de Ciego de Avila. Centro de Bioplantas. Ciego de Avila. p. 67.
- Nugent, G.; Chandler, S.F.; Whiteman, P.; Stevenson1, T.W. 2001. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 67: 85-88.
- Ogata, Y.; Iizuka, M.; Nakayama, D.; Ikeda, M.; Kamada, H.; Koshiha, T. 2005. Possible involvement of abscisic acid in the induction of secondary somatic embryogenesis on seed-coat-derived carrot somatic embryos. *Planta*, 221: 417-423.
- Olmos, S.; Lavia, G.; Drenzo, M.; Mroginski, L.; Echenique, V. 2002. Genetic analysis of variation in micropropagated plants of *Melia azedarach* L. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 38: 617-622.
- Oltremari, A.C.; Dal Vesco, L.L.; Pedrotti, E.L.; Ducroquet, J.P.H.J.; Nodari, R.O.; Guerra, M.P. 2000. Protocolo de micropropagação da goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret) *Ciência Rural*, 30(1):61-68.
- Pages, R. 2004. Fruits take their rightful place. *Granma Internacional*, Diciembre 30, 2004. (Edición digital en inglés). Disponible en: <http://www.granma.cu/ingles/2004/diciembre/juev30/51frutales.html>. Visitado: Mayo 20, 2006.
- Palada-Nicolau, M. 2002. A combined liquid – solid medium procedure for enhancing plant regeneration ability of Norway spruce embryogenic cultures. 1st Int. Symp. on Liquid systems for *in vitro* mass propagation of plants. Ås, Noruega. Mayo/2002. pp. 90-91.
- Papadatou, P.; Pontikis, C.A.; Ephtimiadou, E.; Lydaki, M. 1990. Rapid multiplication of guava seedlings by *in vitro* shoot tip culture. *Scientia Horticulturae* 45: 99-103.
- Parra, R.; Amo-Marco, J.B. 1998. Factors affecting *in vitro* shoot proliferation of *Myrtus communis* L.; a comparison of adult and seedling material. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 34: 104-107.
- Parra, R.; Amo-Marco, J.B. 1999. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (*Myrtus communis* L.). *Plant Cell Reports*, 18: 325-330.

- Parrott, W.A.; Bailey, M.A. 1993. Characterization of somatic embryogenesis of recurrent alfalfa on auxin-free medium. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 32: 69-76.
- Pascual, L.; Marín, J.A. 2005. A liquid 2,4-D pulse increased shoot and root regeneration from leaf explants of adult *Prunus* rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 106 (4): 582-592.
- Pasternak, T.P.; E. Prinsen; F. Ayaydin; P. Miskolczi; G. Potters; H. Asard; H. Van Onckelen; D. Dudits; A. Fehér. 2002. The role of auxin, pH and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.*, 129: 1807-1819.
- Patil, V.; Kuruvinashetti, M. S. 1998. Micropropagation of *Eucalyptus teriticornis* using explants from mature and coppice shoots. *Int. J. of Exp. Bot.* 63(1/2): 129-132.
- Peña, H. A.; Díaz, J. A.; Martínez T. R. 1996. *Fruticultura Tropical*. 2^{da} parte. ICFES. Santa Fe de Bogotá. Colombia. 208 p.
- Perán-Quesada, R.; Sánchez-Romero, C.; Barceló-Muñoz, A.; Pliego-Alfaro, F. 2004. Factors affecting of avocado somatic embryos. *Scientia Horticulturae*, 102: 61-73.
- Pereira, A.M.S.; Bertoni, B.W.; Appezzato-da-Glória, B.; Araújo, A.R.B; Januário, A.H.; Lourenço, M.V.; França, S.C. 2000. Micropropagation of *Pothomorphe umbellata* via direct organogenesis from leaf explants. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 60: 47-53.
- Pérez, A. T. 2000. Propagación *in vitro* del guayabo (*Psidium guajava* L.) cv. Enana Roja Cubana. Trabajo de Diploma presentado en opción del título de Licenciado en Ciencias Biológicas. Julio/2000. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba. pp. 46.
- Pérez, A.T.; Nápoles, L.; Concepción, O.; Trujillo, R. 2002. Multiplicación *in vitro* de brotes de guayabo (*Psidium guajava* L.) cv. Enana Roja Cubana obtenidos a partir de semillas. *Cultivos Tropicales*. 23 (3): 57-61.
- Pérez-Ponce, J.N. 1998. Variación Somaclonal. En: Pérez-Ponce, J.N. (ed.). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba. pp. 105-121.
- Péros, J.P.; Torregrosa, L. ; Berge, G. 1998. Variability among *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity. *J. of Exp.Botany*, 49 (319): 171-179.
- Perrin, Y.; Doumas, P.; Lardet, L.; Carron, M.P. 1997. Endogenous cytokinins and biochemical markers of rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) clone rejuvenation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 47: 239-245.
- Plazek, A.; Filek, M.; Wedsony, M. 1999. Improvement of regeneration ability in *Phleum pratense* L. *in vitro* culture by dicamba. *Acta Physiologiae Plantarum*, 21(4): 397-403.
- Pontikis, C. A. 1996. *Psidium guajava* L. En: Bajaj, Y.P.S. (ed). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, v.35, Trees IV p. 308-320.
- Puigderrajols, P.; Fernández-Guijarro, B.; Toribio, T.; Molinas, M. 1996. Origin and early development of secondary embryos in *Quercus suber* L. *Int. J. Plant Sci.*, 157: 674-684.
- Pumar, Y.; Cabrera, E. 2003. *Frutas Tropicales*. Más años de vida con mejor salud (sitio en línea). Disponible en: <http://www.solysonmagazine.com/item.php?section=40&item=27&issue=81&lang=1>. Visitado en Septiembre del 2004.
- Quiroz-Figueroa, F.R.; Fuentes-Cerda, C.F.J.; Rojas-Herrera, R.; Loyola-Vargas, V.M. 2002. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*, 20:1141-1149.
- Ramírez, A.; Cruz, N.; Franchialfaro, O. 2003. Uso de bioestimuladores en la reproducción de guayaba (*Psidium guajava* L.) mediante el enraizamiento de esquejes. *Cultivos Tropicales*, 24(1): 59-63.

- Ramírez, M.C.; León S.; Urdaneta, A. 1999a. Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* L. y *P. friedrichsthalianum* (Berg.) Nierdz. Rev. Fac. Agron. (LUZ), 16: 243-255.
- Ramírez, M.C.; Salazar, E.G. 1997. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.). Rev. Fac. Agron. (LUZ), 14: 497-506.
- Ramírez, M.C.; Salazar, E.G. 1998. Cultivo *in vitro* de embriones inmaduros del guayabo (*Psidium guajava* L.) Rev. Fac. Agron. (LUZ), 15: 211-221.
- Ramírez, M.C.; Urdaneta, A.; Marín, M. 1999b. Injertación y estaquillado en el guayabo bajo condiciones de bosque muy seco tropical. Rev. Fac. Agron. (LUZ), 16: 36-42.
- Rivera-Domínguez, M.; Manzanilla-Ramírez, M.A.; Robles-González, M.; Gómez-Lim, M.A. 2004. Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration of 'Ataulfo' mango (*Mangifera indica*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 79: 101-104.
- Rodríguez, N.N.; Gordillo, M.; Caballero, S. 1983. Influencia de la sumersión en agua destilada, ácido giberélico y ergostim sobre la germinación de semillas de guayaba (*Psidium guajava*). Ciencia y Técnica en la Agricultura, Cítricos y Otros Frutales. 6(2): 39-48.
- Rodríguez, N.N.; Valdés-Infante, J.; Becker, D.; Velásquez, B.; González, G.; Sourd, D.; Rodríguez, J.; Ritter, E.; Rohde, W. 2005c. Morphological, agronomical and molecular characterization of guava (*Psidium guajava* L.) germplasm in Cuba. CD-ROM: Memorias del Congreso Internacional Biotecnología y Agricultura BIOVEG'2005. Ciego de Avila. Cuba. ISBN: 959-16-0300-2. Febrero, 2005.
- Rodríguez, N.N.; Velásquez, B.; Cabrera, I. 2006. Multiplicación *in vitro* de *Psidium guajava* L. 'Cotorrera' a partir de explantes nodales. Revista CITRIFRUT, 23 (2): 45-52.
- Rodríguez, R.; Álvarez, C.; Centeno, M.L.; Berros, B.; Rodríguez, A. 2005b. Embriogénesis somática y estrategias para superar las limitaciones en leñosas. En: Sánchez-Olate, M. y Ríos, D.G. (eds) Biotecnología vegetal en especies leñosas de interés forestal. Imprenta Austral, Concepción, Chile. pp. 63-77.
- Rodríguez, R.; Fernández, M.; Pacheco, J.; Cañal, M.J. 2005a. Envejecimiento vegetal, una barrera a la propagación, alternativas. En: Sánchez-Olate, M. y Ríos, D.G. (Eds.) Biotecnología vegetal en especies leñosas de interés forestal. Imprenta Austral, Concepción, Chile. pp. 29-48.
- Romano, A.; Barros, S.; Martins-Loução, M.A. 2002. Micropropagation of the Mediterranean tree *Ceratonia siliqua*. Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 68: 35-41.
- Rugini, E. 1984. *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different rootability and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. Scientia Horticulture, 24: 123-134.
- Salisbury, F.B; Ross, C.W. 1992. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica S.A. pp 339-451.
- Saltos, X.; Robalino, D.; Ulloa, A.; Urrutia, A.; Vásconez, C. 2003. Evaluación de los Cambios en las Vías Metabólicas en Guayaba (*Psidium guajava* L.) Subproyecto 6: Propiedades Químicas - Físicas y Organolépticas. Disponible en: <http://www.uta.edu.ec/cenic/pbid178/subproyecto6.htm>. Visitado: 20 de Febrero de 2006.
- Sharma, P.; Pandey, S.; Bhattacharya, A.; Nagar, P.K.; Ahuja, P.S. 2004. ABA associated biochemical changes during somatic embryo development in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. J. Plant Physiol., 161: 1269-1276.
- Sha Valli Khan, P.S.; Asuman, J.F.; Rao, K.R. 1999. Clonal multiplication of *Syzygium alternifolium* (Wight.) Walp., through mature nodal segments. Silvae Genetica, 48 (1): 45-50.

- Shahana, S.; Gupta, S.C. 2002. Somatic embryogenesis in *Sesbania sesban* var. bicolor: A multipurpose fabaceous woody species. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 69: 289-292.
- Siddiqui, Z.M.; Farooq, S. A. 1996. Role of anti-oxidants in the elimination of phenolic compounds from *in vitro* culture of *Psidium guajava* L. (Guava). *Plant Sci.*, vol. 9, no. 2, p. 155-158.
- Singh, A.K.; Chand, S.; Pattnaik, S; Chand, P.K. 2002b. Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of *Dalbergia sissoo* Roxb., a timber yielding tree legume. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 68: 203–209.
- Singh, R.B.; Rastogi, S. S.; Sing, R.; Ghosh, S.; Niaz, M. A. 1992. Effects of guava intake on serum total and high-density lipoprotein cholesterol levels and systemic blood pressure. *Am. J. Cardiology*. 70:1/287-1291.
- Singh, S.K.; Meghwal, P.R.; Sharma, H.C.; Singh, S.P. 2002a. Direct shoot organogenesis on hypocotyl explants from *in vitro* germinated seedlings of *Psidium guajava* L. cv. Allahabad Safeda. *Scientia Horticulturae*, 95:213-221.
- Singh, S.K.; Singh, S.P.; Sharma, H.C. 2001. *In vitro* clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from field-grown mature plants. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 7:33-38.
- Sotak, R.J.; Sommer, H.E.; Merkle, S.A. 1991. Relation of the developmental stage of zygotic embryos of yellow-poplar to their somatic embryogenic potential. *Plant Cell Reports*, 10: 175-178.
- Sotolongo, R.S. 2000. Micropropagación de *P. salutare* (HBK) Berg. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Forestales. Universidad de Pinar del Río. Facultad de Agronomía y Forestal. Pinar del Río. p. 75.
- Sosa, Y.E.; Trujillo, R; Concepción, O. 2004. Estudio bromatológico de líneas de guayaba obtenidas a partir de la autopolinización y micropropagación de la variedad Enana Roja Cubana EEA 18-40. Trabajo de Diploma. Departamento de Producción Agropecuaria. Facultad de Agronomía. Universidad de Ciego de Avila. p. 49.
- SPSS. 2002. Statistics Package for Social Science, User Guide Version 11.5.0, SPSS Inc. for Windows.
- Stasolla, C.; Kong, L.; Yeung, E.C.; Thorpe, T.A. 2002. Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 38 (2): 93-105.
- Stefanello, S.; Dal Vesco, L.L.; Ducroquet, J.P.H.J.; Nodari, R.O.; Guerra, M.P. 2005. Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). *Sci. Hort.*, 106: 117–126.
- Subramanyan, M.D.; Iyer, C.P.A. 1993. Improvement of Guava. In: *Advances in Horticulture*. Eds: K.L. Chadha and O.P. Pareek. Vol 1-Fruits Crops Part 1. Malhotra Publishing House, New Delhi. pp. 337-347.
- Sytsma, K.J.; Litt, A. 2002. Tropical disjunctions in and among the *Myrtaceae* clade (*Myrtaceae*, *Heteropyxidaceae*, *Psiloxylaceae*, *Vochysiaceae*): Gondwanan vicariance or dispersal? (Abstract). Botany 2002 Conference, University of Wisconsin, Madison, WS, USA, August 4-7.
- Tapia, R.; Castillo, R.; Nieves, N.; Blanco, M.A.; González, J.L.; Sánchez, M.; Rodríguez, Y. 1999. Inducción, maduración y encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar (*Saccharum sp.*) Var CP 5243. *Biotecnología Aplicada (Elfos Scientiae)*, 16(1): 20-23.
- Teixeira, P.D.; Lima Da Silva, A.; Ducroquet, J.P.H.J.; Guerra, M.P. 2004. *In vitro* multiplication of *Prunus* spp. rootstocks 'Carelli'. *Rev. Bras. Frutic.*, 26(2): 377-379.

- Tian L.; Wang, H.; Wu, K.; Latoszek-Green, M.; Hu, M.; Miki, B.; Brown, D.C.W. 2002. Efficient recovery of transgenic plants through organogenesis and embryogenesis using a cryptic promoter to drive marker gene expression. *Plant Cell Reports*, 20:1181–1187.
- Tong, F.; Medina, D.; Esparza D. 1991. Variabilidad en poblaciones de guayabo *Psidium guajava* L. del municipio Mara del estado Zulia. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 8(1): 15-27.
- Toribio, M.; Fernández, C.; Celestino, C.; Martínez, M.T.; San-José, M.C.; Vieitez, A.M. 2004. Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 76: 283–287.
- Toussaint, A.N.; Lebrun, A.; Roggemans, J. 1992. Cutting and *in vitro* propagation of *Eugenia smithii* Poir. *Acta Horticulturae*, 314: 77-83.
- Treutter, D. 2001. Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regulation*, 34: 71-89.
- UPOV. 1987. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, homogeneity and stability. Guava TG/110/3. International Union for the Protection of New Varieties of Plants. Génova, Italia.
- Vilchez, J.; Albany, N.; Gómez-Kosky, R. 2001. Inducción de la embriogénesis somática en *Psidium guajava* L. Libro de Reportes Cortos, III Taller Internacional de Biotecnología Vegetal BIOVEG'2001. Ciego de Avila, Cuba. p. 136.
- Vilchez, J.; Albany, N.; Gómez-Kosky, R.; García, L. 2004. Secondary embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. *Tropical Agricultural (Trinidad)*, 81(1): 41-44.
- Vilchez, J.A.; Albany, N.; Gómez-Kosky, R., García, L. 2002. Inducción de embriogénesis somática en *Psidium guajava* L. a partir de embriones cigóticos. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 19: 284-293.
- Villalobos, V. M.; Thorpe, T. A. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Roca, W. M.; Mogrinski, L. A. (Eds). *Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. CIAT, Cali, Colombia. pp. 127-142.
- von Aderkas, P.; Lelub, M.A.; Label, P. 2001. Plant growth regulator levels during maturation of larch somatic embryos. *Plant Physiol. Biochem.*, 39: 495–502.
- von Aderkas, P.; Rohr, R.; Sundberg, B.; Gutmann, M.; Dumont-BéBoux, N.; Lelu, M.A. 2002. Abscisic acid and its influence on development of the embryonal root cap, storage product and secondary metabolite accumulation in hybrid larch somatic embryos. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 69: 111-120.
- von Arnold, S.; Eriksson, T. 1981. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Can. J. Bot.* 59: 870–874.
- von Arnold, S.; Sabala, I.; Bozhkov, P.; Dyachok, J.; Filonova, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 69: 233–249.
- Walker, D.R.; Parrott, W.A. 2001. Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic embryo germination and conversion. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 64: 55–62.
- Walker, T.S.; Pal Bais, H.; Vivanco, J.M. 2002. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). *Phytochemistry*, 60(3): 289-293.
- Wilson, P.G.; O'Brien, M.M.; Gadek, P.A.; Quinn, C.J. 2001. Myrtaceae revisited: A Reassessment of infrafamilial groups. *Amer. J. of Botany*, 88 (11): 2013–2025.
- Witjaksono; Litz, R.E. 1999a. Induction and growth characteristics of embryogenic avocado cultures. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 58: 19–29.
- Witjaksono; Litz, R.E. 1999b. Maturation of avocado somatic embryos and plant recovery. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 58: 141-148.

- Wulff, M.; Peters, J.A. 2002. Regeneração de brotações de macieira (*Malus domestica*, Borkh.) cv. Gala. Rev. Bras. Frutic., 24 (2): 301-305.
- Yadava, U. L. 1994. Physicochemical properties of guava produced in Georgia. Hort.Science, 29: 536-537.
- Zegzouti, R.; Arnould, M.F.; Favre, J.M. 2001. Histological investigation of the multiplication step in secondary somatic embryogenesis of *Quercus robur* L. Ann. For. Sci. 58: 681–690.
- Zhang, B.H.; Liu, F.; Yao, C.B. 2000. Plant regeneration via somatic embryogenesis in cotton. Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 60: 89–94.

ANEXO I. a) Características físico-químicas de los sustratos utilizados.

Sustrato: Zeolita (Yacimiento de Tasajeras, Santi Spiritus) (100%)

Composición química		(%)
Silicio	SiO ₂	66.2
Aluminio	Al ₂ O ₃	11.2
Hierro	Fe ₂ O ₃	2.2
	FeO	0.3
Magnesio	MgO	0.6
Calcio	CaO	4.5
Sodio	Na ₂ O	1.5
Potasio	K ₂ O	1.3
Fósforo	P ₂ O ₅	0.07
Agua	H ₂ O	4.7
Composición Mineral		(%)
Clinoptilolita		40
Modernita		40
Otros (Calcita, Cuarzo y Feldespato)		20
Propiedades Físicas		Valor
Tamaño de la partícula		0.01-1.0 mm
Densidad (δ)		0.37 g.cm ⁻³
Densidad de la fase sólida (γ)		1.77 g.cm ⁻³
Porosidad Total (PT)		80.59 % vol.

Sustrato: Mezcla de Suelo ferralítico rojo compactado eútrico (Hernández *et al.*, 1999) y Cachaza (CAI Azucarero "Ciro Redondo", Ciego de Avila) (1:1 v/v)

Composición química		Valor
Calcio	CaO	224.32 mg.L ⁻¹
Potasio	K ₂ O	108.86 mg.L ⁻¹
Fósforo	P ₂ O ₅	1107.9 mg.L ⁻¹
Materia Orgánica	M.O.	32.1 %
C.E.		1.04 mol.cm ⁻³
pH	-	7.80

ANEXO I. b) Continuación.

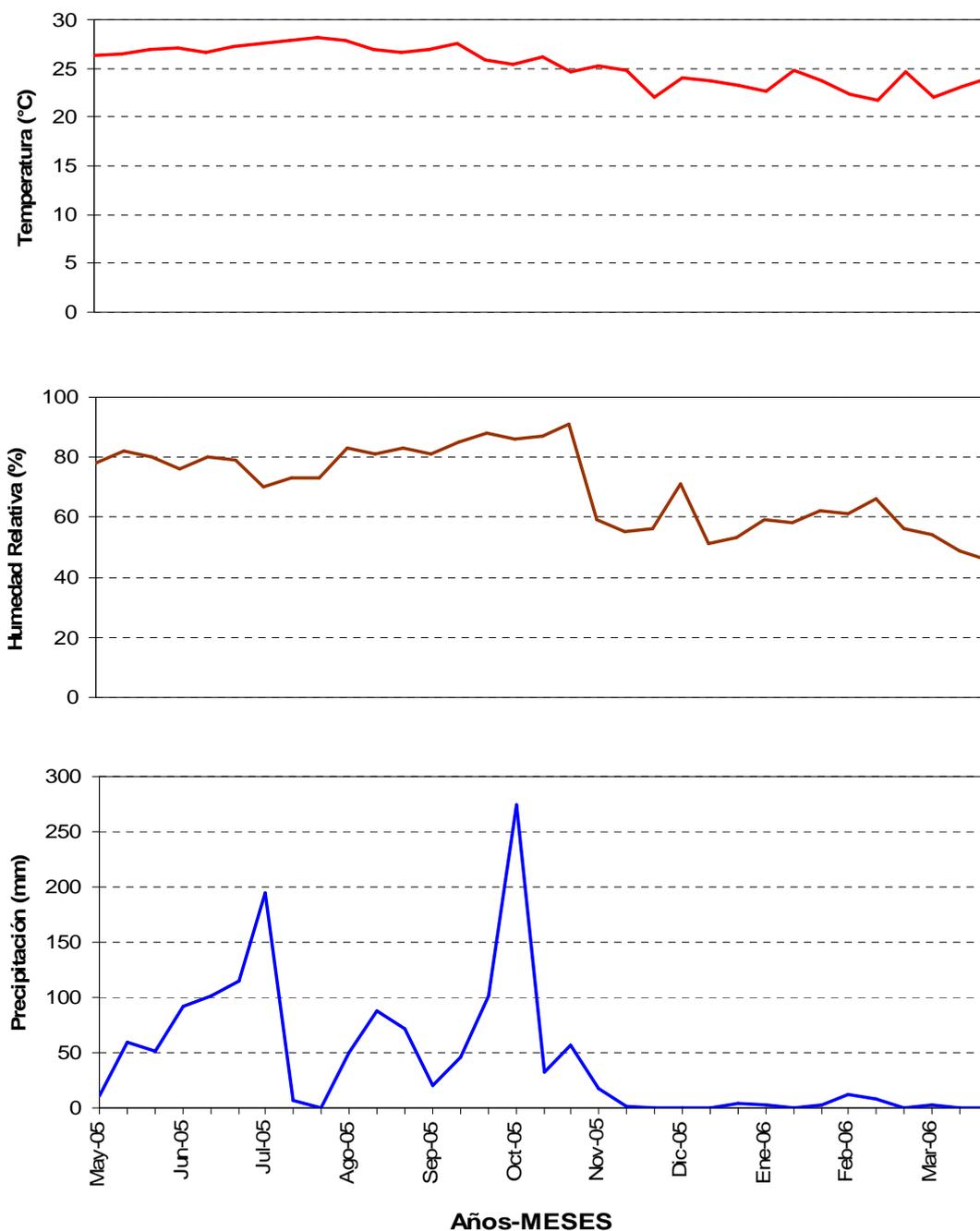
Suelo Ferralítico rojo compactado eútrico (Hernández *et al.*, 1999)

[Correlacionado con *Rhodic eustrustox* de la Soil Taxonomy (Soil Survey Staff, 2003) y con *Rhodic ferrasol* de la World Reference Base (Driessen *et al.*, 2001)]

Características del suelo en el horizonte ferralítico (0-20 cm)

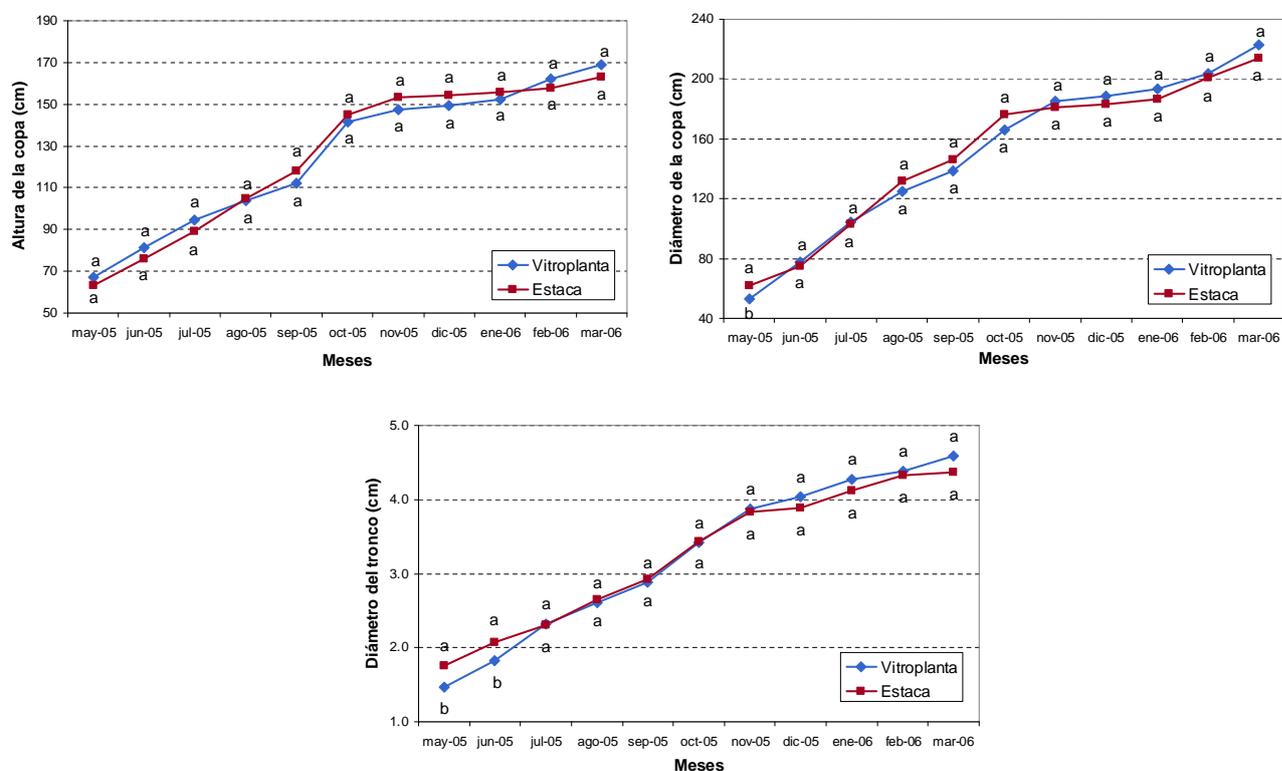
Composición granulométrica		Valor
Arcilla (<2 µm)		65.8
Limo (2 – 20 µm)		6.9
Limo grueso (20 – 50 µm)		1.7
Arena (50 – 200 µm)		11.2
Arena gruesa (200 – 2000 µm)		14.4
Composición química		Valor
Potasio	K ⁺	4.7 µmol.g ⁻¹
Calcio	Ca ²⁺	100 µmol.g ⁻¹
Magnesio	Mg ²⁺	25 µmol.g ⁻¹
Fósforo (asimilable)	P ₂ O ₅	56.0 µg.g ⁻¹
Materia Orgánica	M.O.	2.38%
pH		7.1

ANEXO II. Condiciones climatológicas de la región durante el período de experimentación en campo.

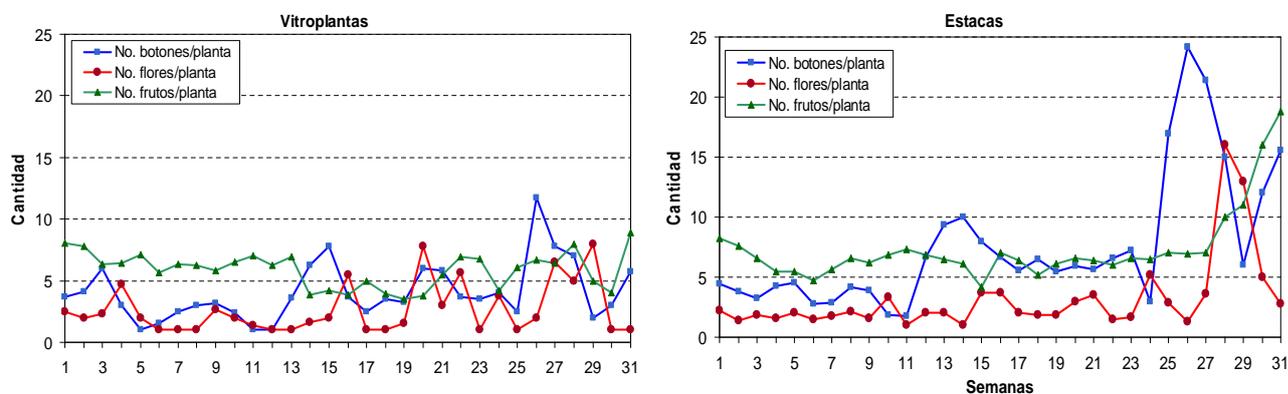


Distribución decenal de la temperatura media, la humedad relativa del aire y las precipitaciones para la región de Modesto Reyes desde mayo/2005 hasta marzo/2006. [Fuente: INSMET, Centro Meteorológico Provincial, Ciego de Avila].

ANEXO III. a) Resultados del comportamiento de las variables fenológicas evaluadas en el experimento 3.1.5.1.

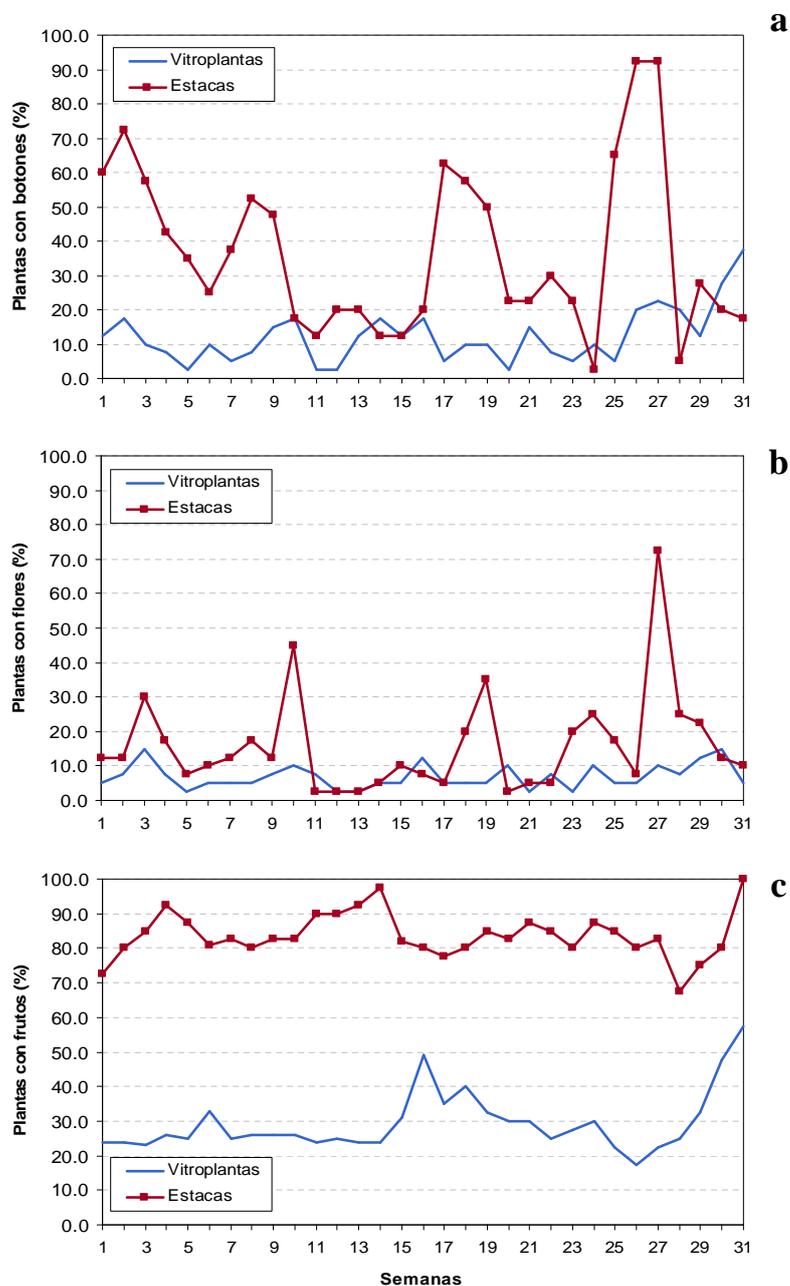


Comportamiento de las principales variables de crecimiento de las plantas de guayabo cv. Enana Roja Cubana, provenientes del cultivo *in vitro* (vitroplanta) y del enraizamiento de esquejes (estaca) durante 11 meses de evaluación. A) Altura de la copa, B) Diámetro de la copa y C) Diámetro del tronco. (En cada momento de evaluación, medias con letras desiguales difieren estadísticamente según prueba paramétrica t-student, para $p < 0.05$).

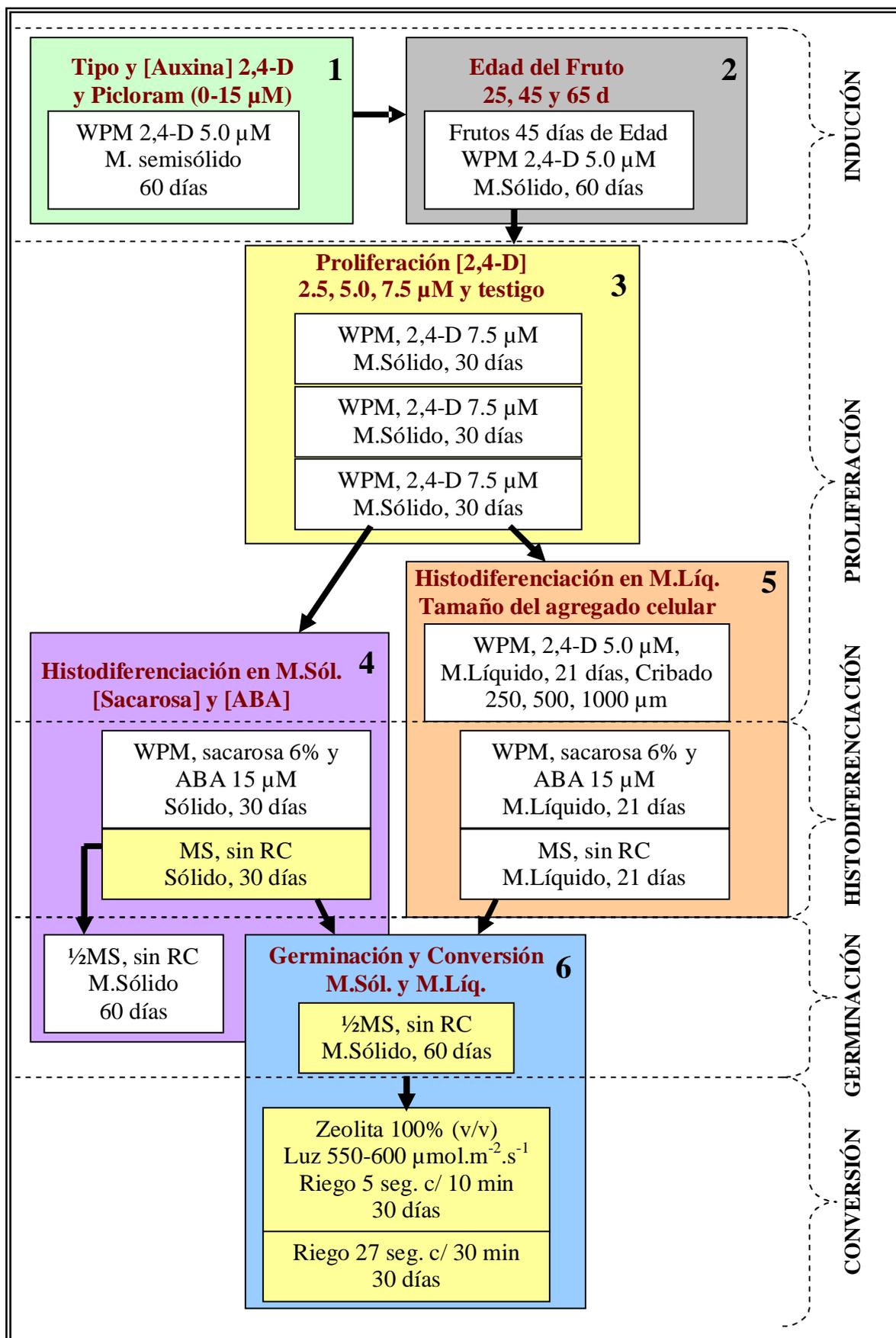


Comportamiento del número de botones, flores y frutos por planta durante un período de evaluación de las últimas 31 semanas de cultivo de las plantas de guayabo cv. Enana Roja Cubana, provenientes del cultivo *in vitro* (vitroplantas) y del enraizamiento de esquejes (estacas).

ANEXO III. b) (Continuación de anexo anterior).



Comportamiento del porcentaje de plantas con botones (a), con flores (b), y con frutos (c), durante un período de evaluación de las últimas 31 semanas de cultivo de las plantas de guayabo cv. Enana Roja Cubana, provenientes del cultivo *in vitro* (vitroplantas) y del enraizamiento de esquejes (estacas).



 Descripción de las variables fenológicas evaluadas en el experimento de campo.

No.	Variabes	UM	Frecuencia de evaluación	Descripción
1	Altura de la planta o copa	cm	Mensual	Se midió partiendo del tronco colocando la regla graduada en centímetro de forma vertical hasta alcanzar la mayor altura de la planta
2	Diámetro de la copa	cm	Mensual	Se midió colocando la regla de forma horizontal en el centro de la planta y perpendicular a la dirección del surco, midiéndose la mayor longitud alcanzada por las ramas a ambos lados
3	Diámetro del tronco	cm	Mensual	Se midió con un pie de rey a la altura de 10 cm de la superficie del suelo
4	Número de botones florales por planta*	u	Semanal	Se contaron en toda la planta, se consideró el botón floral desde la fase 1 hasta la fase 10 según la clasificación realizada por (Caraballo, 2001)
5	Número de flores por planta	u	Semanal	Se contaron en todo el árbol, se consideraron flores cuando estaban totalmente abiertas de forma tal que se le pudieran observar todos sus vértices florales
6	Números de frutos por planta	u	Semanal	Se contaron directamente en toda la planta Se consideraron frutos, a partir de la dehiscencia de los pétalos y estambres, hasta su maduración y cosecha
7	Masa fresca de los frutos al ser cosechados	g	Semanal	Se realizó con ayuda de una balanza técnica con la mayor rapidez posible después de la cosecha para evitar alteración en la evaluación. Los frutos se cosecharon en estado de madurez fisiológica

* Las evaluaciones en los botones, flores y frutos, se mantuvieron hasta comenzar la cosecha, después de esta se detuvo la evaluación de estos indicadores. La clasificación empleada por Caraballo (2001) solo se utilizó con el objetivo de identificar los botones florales.

Tabla 2. Descripción de las variables bromatológicas evaluadas en el experimento de campo.

No.	Tipo de variable	VARIABLES	UM	Descripción
1	Física cuantitativa	Diámetro polar del fruto (DP)	cm	Se midió con un pie de rey la distancia entre el extremo distal y proximal del fruto
2	Física cuantitativa	Diámetro ecuatorial del fruto (DE)	cm	Se midió con un pie de rey la distancia entre los extremos ecuatoriales del fruto
3	Física cuantitativa	Relación DP:DE	u	Se calculó la relación para cada fruto.
4	Física cuantitativa	Diámetro de la base de la corola	cm	Se midió con un pie de rey
5	Física cuantitativa	Masa fresca del fruto	g	Se realizó con ayuda de una balanza técnica con la mayor rapidez posible después de la cosecha
6	Física cuantitativa	Diámetro del centro	cm	Se seccionó el fruto al 50% de su diámetro polar y se midió con un pie de rey el diámetro de la porción distal del fruto
7	Física cuantitativa	Grosor del mesocarpo	cm	Se midió con el pie de rey el grosor desde la parte exterior hasta la región de división mesocarpo/endocarpo
8	Física cuantitativa	Cantidad de semillas por fruto	u	Los frutos cortados se despulparon y las semillas se separaron por cribado y se enjuagaron. Luego éstas se contaron
9	Física cuantitativa	Masa fresca de 100 semillas	g	Las semillas cuantificadas se secaron a temperatura ambiente por 24 h. Luego se pesaron en balanza analítica
10	Física cualitativa	Forma del fruto	escala	Según escala: 1 redondo, 2 ovoide, 3 pera
11	Física cualitativa	Forma del extremo peduncular del fruto*	escala	Según escala: 1 ampliamente redondeado, 2 redondeado, 3 truncado, 4 aguzado, 5 con cuello
12	Física cualitativa	Color de la piel del fruto*	escala	Según escala: 1 verde-amarillo pálido, 2 amarillo pálido, 3 amarillo intenso, 4 naranja, 5 verde-naranja, 6 verde intenso, 7 rojo
13	Física cualitativa	Textura de la piel del fruto*	escala	Según escala: 1 lisa, 2 rugosa, 3 irregular
14	Física cualitativa	Color de la pulpa del fruto*	escala	Según escala: 1 blanco, 2 crema, 3 rosado pálido, 4 rosado, 5 rosado intenso, 6 naranja intenso, 7 naranja
15	Física cualitativa	Uniformidad del color de la pulpa del fruto	escala	Según escala: 0 no uniforme, 1 uniforme
16	Física cualitativa	Número de carpelos	u	Por conteo directo al ser seccionados los frutos
17	Química cuantitativa	Semisólidos solubles totales	°Brix	Según Normas Cubanas 77-22-4 (1982).
18	Química cuantitativa	pH	u-pH	Según Normas Cubanas 77-22-1 (1982).
19	Química cuantitativa	Acidez total titulable	%	Según Normas Cubanas 77-22-7 (1982).
20	Química cuantitativa	Vitamina C (Acido ascórbico)	mg/100 g de masa fresca	Según Normas Cubanas 77-22-16 (1982).

* Escala cualitativa descrita por la guía UPOV (1987).

Tabla 5. Contenido de compuestos fenólicos en las yemas apicales de guayabo colocadas en Nitrógeno líquido o en una solución antioxidante estéril (PVPP 250 mg.L⁻¹), de acuerdo al origen topofísico del brote en el árbol.

Factores y Niveles		Tratamientos (Interacción A x B)	Contenido de fenólicos (mg.g ⁻¹ de masa fresca)		
A: Solución	B: Origen del explante		^x Totales	^x Ligados a las paredes celulares	^x Solubles en la planta
N ₂ Líquido	Copa	I	22.93 a	10.92 a	12.03 a
	Tronco	II	18.83 b	6.94 b	11.89 a
	Raíz	III	15.31 c	7.01 b	8.29 b
PVPP (250 mg.L ⁻¹)	Copa	IV	9.26 d	3.31 c	5.95 c
	Tronco	V	7.37 e	3.08 c	4.30 d
	Raíz	VI	6.58 e	3.23 c	3.34 e
Significación			*	*	*
EEx			0.18	0.14	0.08
CV			0.028	0.039	0.020

(Medias con letras desiguales difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA bifactorial y DHS de Tukey, para $p < 0.05$. EEx: error estándar de la media, CV: coeficiente de variación, ^x cada valor representa el promedio de tres réplicas).

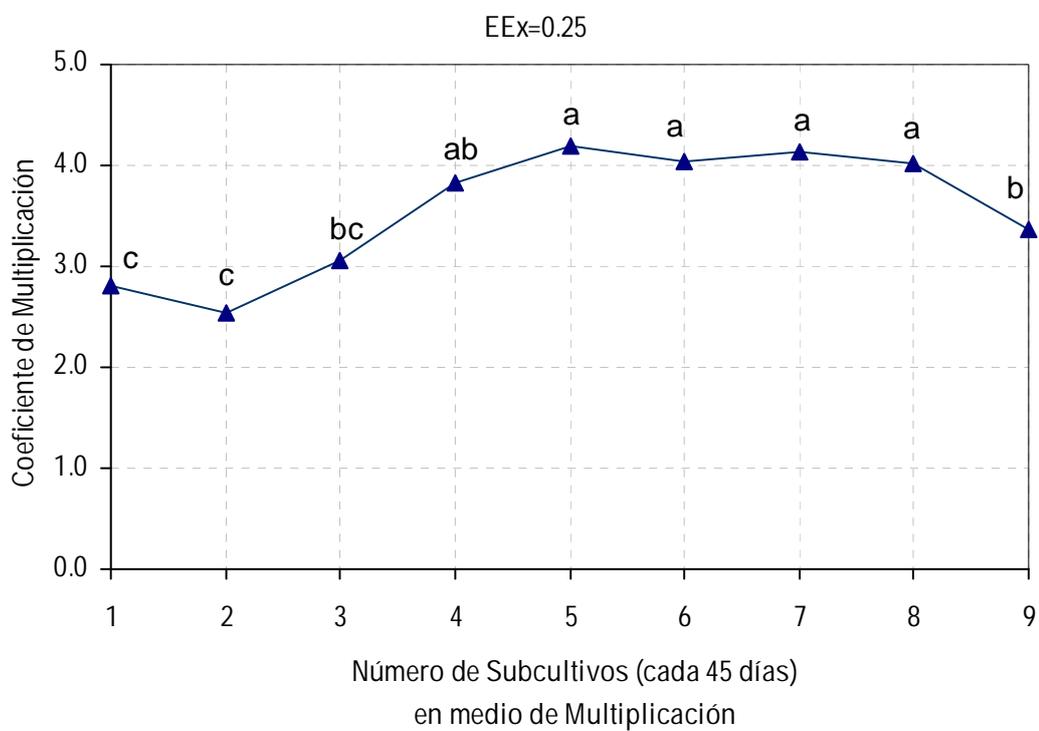


Figura 4. Efecto del número de subcultivos en medio de multiplicación o proliferación *in vitro* (MS + BAP $2.2 \mu\text{mol.L}^{-1}$) sobre el coeficiente de multiplicación de los brotes de guayabo cv. Enana Roja Cubana. Medias con letras iguales no difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA de un factor y DHS de Tukey para $p < 0.05$ y $n = 42$. EEx: error estándar de la media.

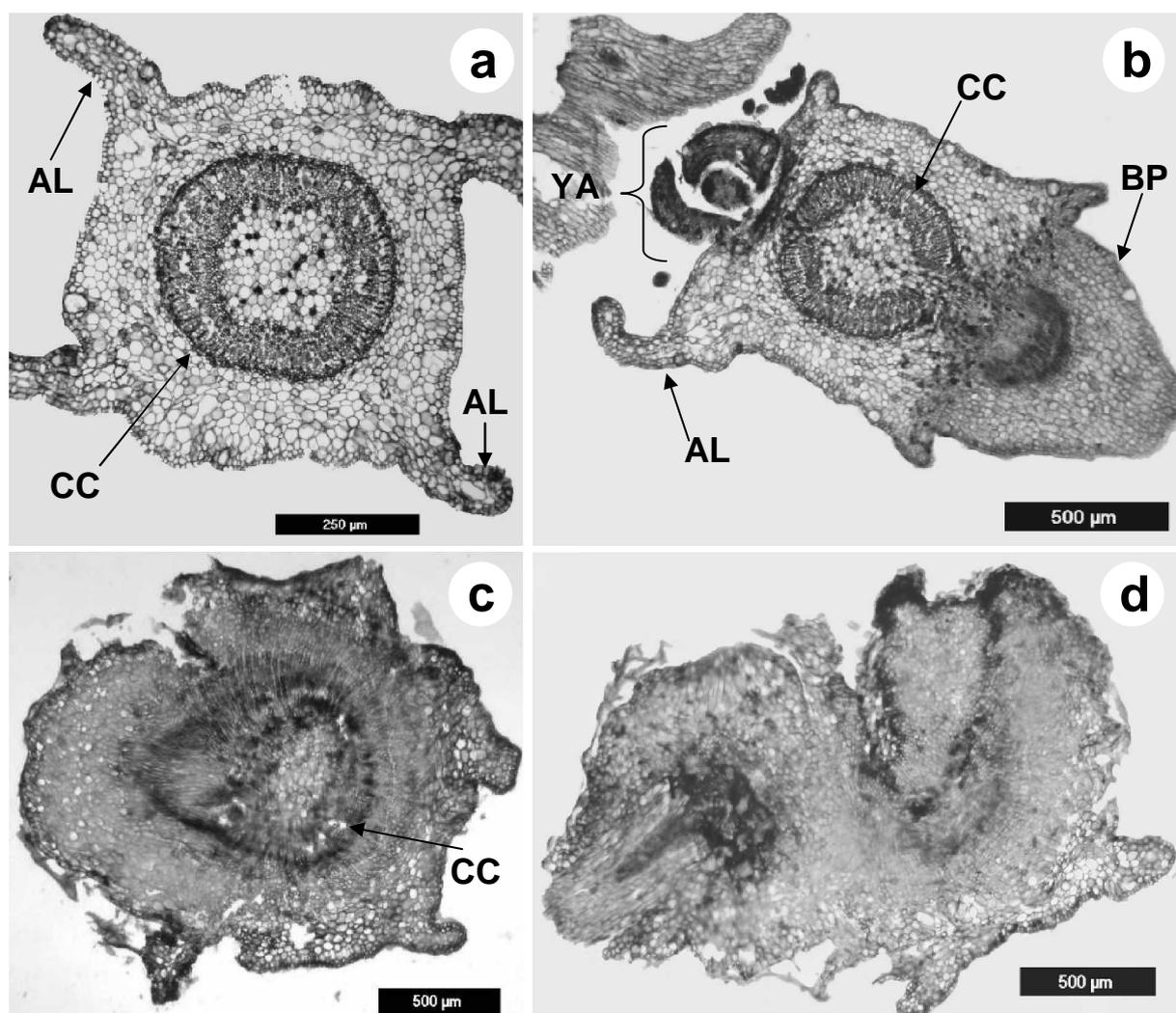


Figura 5. Secuencia histológica del enraizamiento *in vitro* de brotes de guayabo (*P. guajava* L.). a) y b) Secciones transversales del tallo a nivel del entrenudo y de la región nodal, respectivamente, en brotes muestreados antes de iniciar el cultivo de enraizamiento. c) Sección transversal del tallo en la región basal del brote a los 7 días de cultivo en medio de enraizamiento (MS sin reguladores del crecimiento), que muestra una deformación del cilindro central, con divisiones celulares que dan inicio al crecimiento de la raíz. d) Sección transversal de la porción basal del tallo de un brote a los 15 d de cultivo que muestra como las raíces formadas mantienen continuidad vascular con el tallo. AL: aleros laterales, CC: cilindro central, YA: yemas axilares, BP: base del pecíolo de las hojas.

Tabla 9. Comparación entre plantas de guayabo procedentes del cultivo *in vitro* (vitroplanta) y del enraizamiento de esquejes (estaca), en función de las variables fenológicas evaluadas, al inicio del estudio y después de 11 meses de cultivo en campo (Final).

Variables (UM)	Momento evaluación	Tipo de planta		Sig.	EEx	CV
		Vitroplanta	Estaca			
Variables de crecimiento						
^x Altura de la copa (cm)	Inicio	68.1 a	62.3 a	ns	2.39	0.23
	Final	169.7 a	162.4 a	ns	4.18	0.16
^x Diámetro de la copa (cm)	Inicio	52.5 b	62.5 a	*	2.63	0.30
	Final	222.3 a	209.3 a	ns	6.01	0.18
^x Diámetro del tronco (cm)	Inicio	1.5 b	1.8 a	*	0.05	0.22
	Final	4.6 a	4.4 a	ns	0.11	0.16
Variables reproductivas						
^x No. Botones / planta (u)	Inicio	3.7 a	4.4 a	ns	0.67	0.29
	Final	5.8 b	15.6 a	*	3.36	0.36
^x No. Flores / planta (u)	Inicio	2.5 a	2.2 a	ns	0.65	0.55
	Final	1.0 a	2.8 a	ns	0.55	0.60
^x No. Frutos / planta (u)	Inicio	8.1 a	8.2 a	ns	1.94	0.21
	Final	8.9 b	38.3 a	*	2.54	0.31
^y Promedio plantas con botones (%)	Inicio	11.9 b	54.1 a	*	3.93	0.29
	Final	24.4 a	16.3 a	ns	4.85	0.39
^y Promedio plantas con flores (%)	Inicio	8.8 a	16.9 a	ns	3.00	0.48
	Final	10.0 a	16.3 a	ns	2.85	0.44
^y Promedio plantas con frutos (%)	Inicio	24.3 b	76.7 a	*	2.27	0.18
	Final	40.6 b	75.0 a	*	6.89	0.27
Rendimiento (kg fruta/árbol)	-----	6.49 b	11.61 a	*	1.09	0.38

(Para cada variable, medias con letras desiguales difieren estadísticamente según prueba paramétrica de *t*-Student, para $p < 0.05$. UM: unidad de medida, ns: no significativo, Sig.: significación, EEx: error estándar de la media, CV: coeficiente de variación, ^x cada valor representa el promedio de 48 árboles, ^y cada valor representa el promedio de 6 repeticiones de 8 árboles cada una).

Tabla 10. Frecuencia de las características físico-cualitativas del fruto observadas durante el estudio bromatológico comparativo entre plantas de guayabo provenientes del cultivo *in vitro* (vitroplanta) y del enraizamiento de esquejes (estaca).

Variables físico-cualitativas de los frutos	Característica observada y frecuencia			
	Vitroplanta		Estaca	
	Tipo	Cantidad (%)	Tipo	Cantidad (%)
Forma del fruto	Ovoide	48 (100.0)	Ovoide	48 (100.0)
Forma del extremo peduncular del fruto	Redondeado	44 (91.67)	Redondeado	45 (93.75)
	Truncado	4 (8.33)	Truncado	5 (10.42)
	Aguzado	3 (6.25)		
Relieve de la superficie del fruto	Liso	46 (95.84)	Liso	47 (97.92)
	Irregular	2 (4.17)	Irregular	1 (2.08)
Color de la piel del fruto	Amarillo intenso	48 (100.0)	Amarillo intenso	48 (100.0)
Color de la pulpa del fruto	Rosado	48 (100.0)	Rosado	48 (100.0)
Uniformidad del color de la pulpa	Uniforme	48 (100.0)	Uniforme	48 (100.0)
	5	43 (89.58)	5	47 (97.92)
	6	2 (4.17)	4	1 (2.08)
	4	1 (2.08)		

(El porcentaje se calculó a partir de la relación entre la cantidad de árboles con frutos diferentes y el total de árboles evaluados, para cada variable cualitativa. Se evaluaron un total de 480 frutos por tratamiento, a razón de 80 frutos por repetición).

Tabla 11. Características físico-cuantitativas de los frutos cosechados durante el estudio bromatológico comparativo entre plantas de guayabo provenientes del cultivo *in vitro* (vitroplanta) y del enraizamiento de esquejes (estaca).

Variables (UM)	Tipo de planta		Sig.	EEx	CV
	Vitroplanta	Estaca			
Masa fresca del fruto (g)	153.16	143.73	ns	5.042	0.329
DP: Diámetro polar del fruto (cm)	7.33	7.10	ns	0.086	0.134
DE: Diámetro ecuatorial del fruto (cm)	6.48	6.12	ns	0.075	0.115
Relación DP:DE	1.173	1.131	ns	0.006	0.062
Diámetro de la base de la corola (cm)	1.47 a	1.31 b	*	0.028	0.193
Diámetro de la cavidad del cáliz (cm)	3.92	3.76	ns	0.047	0.119
Grosor del mesocarpio (cm)	2.56	2.36	ns	0.057	0.226
No. de semillas / fruto (u)	281	236	ns	16.532	0.362
Masa fresca de 100 semillas (g)	0.99	1.03	ns	0.045	0.249

(Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según prueba paramétrica de *t-Student*, para $p < 0.05$. UM: unidad de medida, ns: no significativo, EEx: error estándar de la media, CV: coeficiente de variación, cada valor representa el promedio de 480 frutos por tratamiento, a razón de 80 frutos por repetición).

Tabla 14. Efecto de la edad y tamaño del fruto, sobre los porcentajes de contaminación y fenolización a los 15 d de cultivo, y la respuesta morfológica del embrión cigótico de guayabo, a los 60 d de cultivo en medio de inducción WPM + 2,4-D 5.0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Edad del fruto (días post- antesis)	Diámetro ecuatorial del fruto (cm)	Contaminación		Fenolización		Formación de:					
		Hongo (%)	Bacteria (%)	(%)	(%)	Callo primario (%)	Callo con estructuras embriogénicas (%)				
	\bar{x} Media \pm EE \times	\bar{y} Media SR									
25	2.3 \pm 0.23	0.0	4.0	4.0	6.7	4.0	5.8 b	12.0	3.2 c	8.0	3.6 b
45	3.4 \pm 0.31	4.0	7.9	12.0	8.2	4.0	5.8 b	78.0	12.7 a	42.0	12.8 a
65	4.1 \pm 0.26	24.0	9.6	32.0	9.1	28.0	12.4 a	52.0	8.1 b	28.0	7.6 b
Significación		ns	ns	ns	ns	*	*	*	*	*	*
EEx		6.72	6.72	7.61	7.61	3.81	3.81	9.13	9.13	8.09	8.09
CV		0.60	0.60	0.48	0.48	0.32	0.32	0.18	0.18	0.22	0.22

(Para SR con letras desiguales, las medias difieren significativamente según pruebas no-paramétricas de Kruskal Wallis y Student-Newman-Keuls, para $p < 0.05$. SR: suma de rango, EE \times : error estándar de la media, CV: coeficiente de variación, ns: no significativo, * cada valor es el promedio de 12 frutos inmaduros, \bar{y} cada valor representa el promedio de cinco frascos de cultivo con cinco explantes cada uno).

Tabla 18. Efecto del tamaño de los agregados celulares sobre la cantidad de embriones somáticos por mililitro de medio de cultivo, formados durante el proceso de histodiferenciación de embriones somáticos en el guayabo, después de 21 d de cultivo en medio líquido WPM + ABA 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ + sacarosa 60.0 g.L^{-1} , seguido de otros 21 d de cultivo en medio líquido MS sin reguladores del crecimiento.

Tamaño de los agregados	^x No. de embriones somáticos / mL									
	Globular-Oblongo		Corazón		Torpedo		Cotiledonar		Total	
	Media	SR	Media	SR	Media	SR	Media	SR	Media	SR
I: 0-250 μm	39.5	41.20 b	1.5	55.80	0.0	44.50 b	0.0	48.50 b	40.0	36.88 b
II: 250-500 μm	220.7	61.94 a	13.9	62.18	27.3	68.89 a	22.7	68.39 a	233.6	64.30 a
III: 500-1000 μm	212.2	59.53 a	9.7	61.97	35.7	68.91 a	19.8	66.35 a	226.5	63.18 a
IV: >1000 μm	215.2	68.39 a	2.6	56.50	4.3	49.48 b	1.3	50.14 b	222.4	64.89 a
Significación	*		ns		*		*		*	
EEx	7.94		0.67		1.42		0.82		9.22	
CV	0.482		0.847		0.359		0.354		0.481	

(Para SR con letras desiguales, las medias difieren significativamente según pruebas no-paramétricas de Kruskal Wallis y Student-Newman-Keuls, para $p < 0.05$. SR: suma de rango, EEx: error estándar de la media, CV: coeficiente de variación, * cada valor representa el promedio de nueve muestras evaluadas de tres erlenmeyers por tratamiento, a razón de tres muestreos por erlenmeyer).

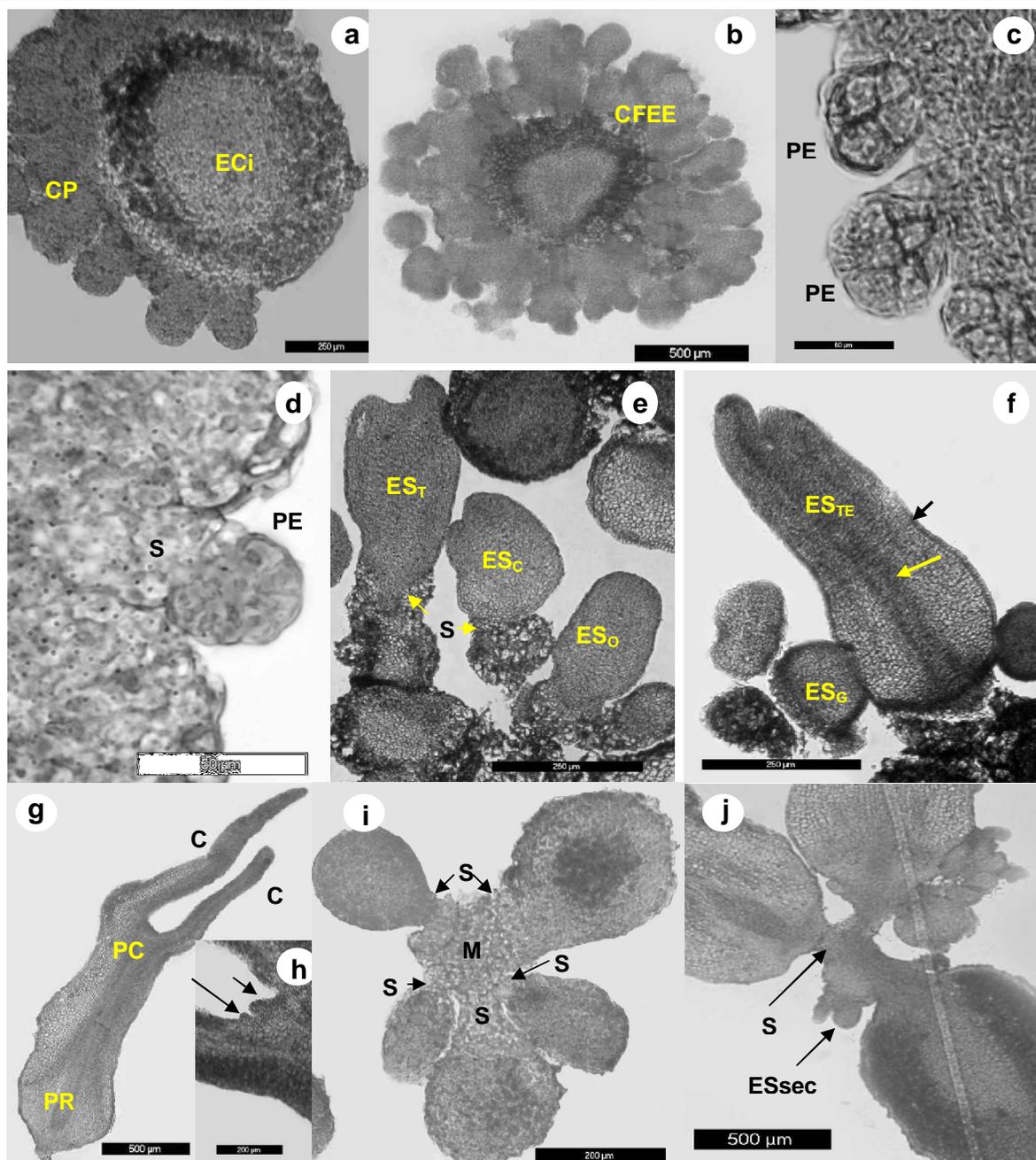


Figura 15. Secuencia histológica de la embriogénesis somática *in vitro* en el guayabo (*P. guajava*). a) Sección transversal del embrión cigótico inmaduro (ECi) con crecimiento del callo primario (CP). b) Callo friable con estructuras embriogénicas (CFEE) en medio de proliferación con 2,4-D $7.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$. c) Etapa inicial de histodiferenciación con la formación de varios pro-embryones (PE) en los CFEE. d) Pro-embrión con un suspensor (S) de múltiples hileras de células. e) Asincronía durante el desarrollo de los embryones somáticos. f) Tejido del pro-cambium (flecha larga) y la protodermis (flecha corta), en embrión somático en etapa torpedo elongado (ES_{TE}). g) Embrión somático cotiledonar con un desarrollo completo de los cotiledones (C) y del eje embriónal (PC: polo caulinar; PR: polo radicular). h) Formación del domo meristemático caulinar (flecha corta) y desarrollo del primer primordio foliar (flecha larga). i) Grupo o agregado de embryones somáticos en medio líquido, que muestra las diferencias entre los tejidos del embrión y la matriz (M) que los sostiene. j) Región radicular de tres embryones somáticos en etapas avanzadas con formación de embryones somáticos secundarios (ES_{sec}) a partir de tejidos del suspensor (S). (ES_o : embrión somático oblongo, ES_c : corazón, ES_T : torpedo, ES_{TE} : torpedo-elongado).

Tabla 14. Efecto de la edad y tamaño del fruto, sobre los porcentajes de contaminación y fenolización a los 15 d de cultivo, y la respuesta morfogénica del embrión cigótico de guayabo, a los 60 d de cultivo en medio de inducción WPM + 2,4-D 5.0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Edad del fruto (días post- antesis)	Diámetro ecuatorial del fruto (cm)	Contaminación				Fenolización (%)	Formación de:			
		Hongo (%)		Bacteria (%)			Callo primario (%)		Callo con estru embriogénica	
		^x Media±EE _x	^y Media SR	^y Media SR	^y Media SR		^y Media SR	^y Media SR	^y Media SR	^y Media SR
25	2.3±0.23	0.0 6.5	4.0 6.7	4.0 5.8 b	12.0 3.2 c	8.0 3.6				
45	3.4±0.31	4.0 7.9	12.0 8.2	4.0 5.8 b	78.0 12.7 a	42.0 12.3				
65	4.1±0.26	24.0 9.6	32.0 9.1	28.0 12.4 a	52.0 8.1 b	28.0 7.6				
Significación		ns	ns	*	*	*				
EE _x		6.72	7.61	3.81	9.13	8.09				
CV		0.60	0.48	0.32	0.18	0.22				

(Para SR con letras desiguales, las medias difieren significativamente según pruebas no-paramétricas de Kruskal Wallis y Student-Newman-Keuls, para $p < 0.05$. SR: suma de rango, EE_x: error estándar de la media, CV: coeficiente de variación, ns: no significativo, ^xcada valor es el promedio de 12 frutos inmaduros, ^ycada valor representa el promedio de cinco frascos de cultivo con cinco explantes cada uno).

Tabla 18. Efecto del tamaño de los agregados celulares sobre la cantidad de embriones somáticos por mililitro de medio de cultivo, formados durante el proceso de histodiferenciación de embriones somáticos en el guayabo, después de 21 d de cultivo en medio líquido WPM + ABA 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ + sacarosa 60.0 g.L⁻¹, seguido de otros 21 d de cultivo en medio líquido MS sin reguladores del crecimiento.

Tamaño de los agregados	^x No. de embriones somáticos / mL									
	Globular- Oblongo		Corazón		Torpedo		Cotiledonar		Total	
	Media	SR	Media	SR	Media	SR	Media	SR	Media	SR
I: 0- 250 μm	39.5	41.20 b	1.5	55.80	0.0	44.50 b	0.0	48.50 b	40.0	36.88 b
II: 250- 500 μm	220.7	61.94 a	13.9	62.18	27.3	68.89 a	22.7	68.39 a	233.6	64.30 a
III: 500- 1000 μm	212.2	59.53 a	9.7	61.97	35.7	68.91 a	19.8	66.35 a	226.5	63.18 a
IV: >1000 μm	215.2	68.39 a	2.6	56.50	4.3	49.48 b	1.3	50.14 b	222.4	64.89 a
Significación		*	ns	*	*	*				
EE _x		7.94	0.67	1.42	0.82	9.22				
CV		0.482	0.847	0.359	0.354	0.481				

(Para SR con letras desiguales, las medias difieren significativamente según pruebas no-paramétricas de Kruskal Wallis y Student-Newman-Keuls, para $p < 0.05$. SR: suma de rango, EE_x: error estándar de la media, CV: coeficiente de variación, ^xcada valor representa el promedio de nueve muestras evaluadas de tres erlenmeyers por tratamiento, a razón de tres muestreos por erlenmeyer).

Tabla 10. Frecuencia de las características físico-cualitativas del fruto observadas durante el estudio bromatológico comparativo entre plantas de guayabo provenientes del cultivo *in vitro* (vitroplanta) y del enraizamiento de esquejes (estaca).

Variables físico-cualitativas de los	Característica observada y frecuencia
--------------------------------------	---------------------------------------

frutos	Vitroplanta		Estaca	
	Tipo	Cantidad (%)	Tipo	Cantidad (%)
Forma del fruto	Ovoide	48 (100.0)	Ovoide	48 (100.0)
Forma del extremo peduncular del fruto	Redondeado	44 (91.67)	Redondeado	45 (93.75)
	Truncado	4 (8.33)	Truncado	5 (10.42)
	Aguzado	3 (6.25)		
Relieve de la superficie del fruto	Liso	46 (95.84)	Liso	47 (97.92)
	Irregular	2 (4.17)	Irregular	1 (2.08)
Color de la piel del fruto	Amarillo intenso	48 (100.0)	Amarillo intenso	48 (100.0)
Color de la pulpa del fruto	Rosado	48 (100.0)	Rosado	48 (100.0)
Uniformidad del color de la pulpa	Uniforme	48 (100.0)	Uniforme	48 (100.0)
	5	43 (89.58)	5	47 (97.92)
	6	2 (4.17)	4	1 (2.08)
Número de carpelos	4	1 (2.08)		

(El porcentaje se calculó a partir de la relación entre la cantidad de árboles con frutos diferentes y el total de árboles evaluados, para cada variable cualitativa. Se evaluaron un total de 480 frutos por tratamiento, a razón de 80 frutos por repetición).

Tabla 4. Efecto de los factores concentración de BAP y tipo de explante sobre la respuesta morfogénica de las yemas de plantas de campo de guayabo, durante el establecimiento *in vitro* en un medio basal MS + AIA $2.85 \mu\text{mol.L}^{-1}$, a los 45 d de cultivo.

Factores	Niveles	Brotación (%)	Longitud del brote (cm)
Concentración de BAP ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	0.0	10.0 c	0.54 c
	2.2	40.0 b	1.68 a

	4.4	60.0 a	1.03 b
	6.7	51.7 ab	0.72 bc
Sig.		*	*
EEx		4.28	0.09
N		12	60
Tipo de explante	ápice	32.5 b	1.09 a
	segmento nodal	48.3 a	0.89 b
Sig.		*	*
EEx		4.48	0.12
N		24	120
CV		0.66	0.60

(Medias con letras desiguales difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA bifactorial y de DHS de Tukey, para $p < 0.05$. EEx: error estándar de la media, CV: coeficiente de variación, N: número de réplicas).

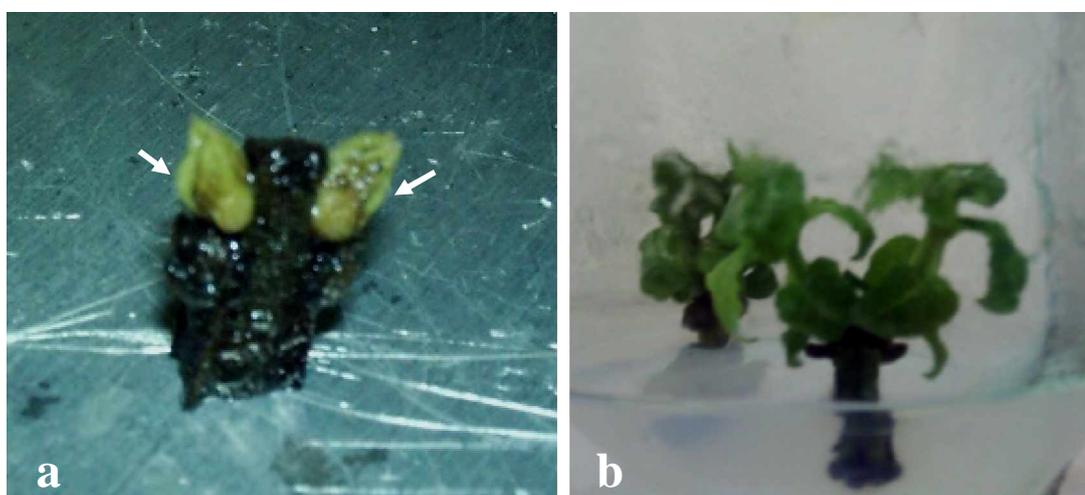


Figura 2. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de plantas de campo de guayabo cv. Enana Roja Cubana. a) Inducción de la brotación de las dos yemas axilares (flechas), a los 15 días de iniciado el cultivo en medio de establecimiento. b) Dos brotes axilares crecidos a los 45 días de cultivo, cuando el explante se consideró establecido a las condiciones *in vitro*.

Tabla 6. Efecto del origen topofísico del material vegetal (brotes) sobre la respuesta morfológica de los explantes de guayabo en el establecimiento *in vitro*, a los 45 d de iniciado el cultivo.

Origen del brote	Contaminación (%)		Fenolización (%)		Brotación (%)		No. brotes/explante	
	^x Media	SR	^x Media	SR	^x Media	SR	^y Media	SR
Copa	26.0	6.10	98.0	12.4 a	8.0	4.50 b	1.00	8.00 b
Tronco	28.0	9.60	68.0	5.60 b	16.0	6.50 b	1.20	10.10 b
Raíz	24.0	8.30	16.0	3.00 c	64.0	13.00 a	1.56	13.09 a
Significación	ns		*		*		*	
EEx	3.30		9.68		7.00		0.14	
CV	0.565		0.618		0.924		0.462	

(Para SR con letras desiguales, las medias difieren significativamente según pruebas no-paramétricas de Kruskal-Wallis y Student-Newman-Keuls, para $p < 0.05$. SR: suma de rango, EEx: error estándar de la media, CV: coeficiente de variación, ns: no significativo, ^xcada valor representa el promedio de 5 grupos de 5 yemas cada uno, ^y cada valor representa el promedio de 25 yemas).

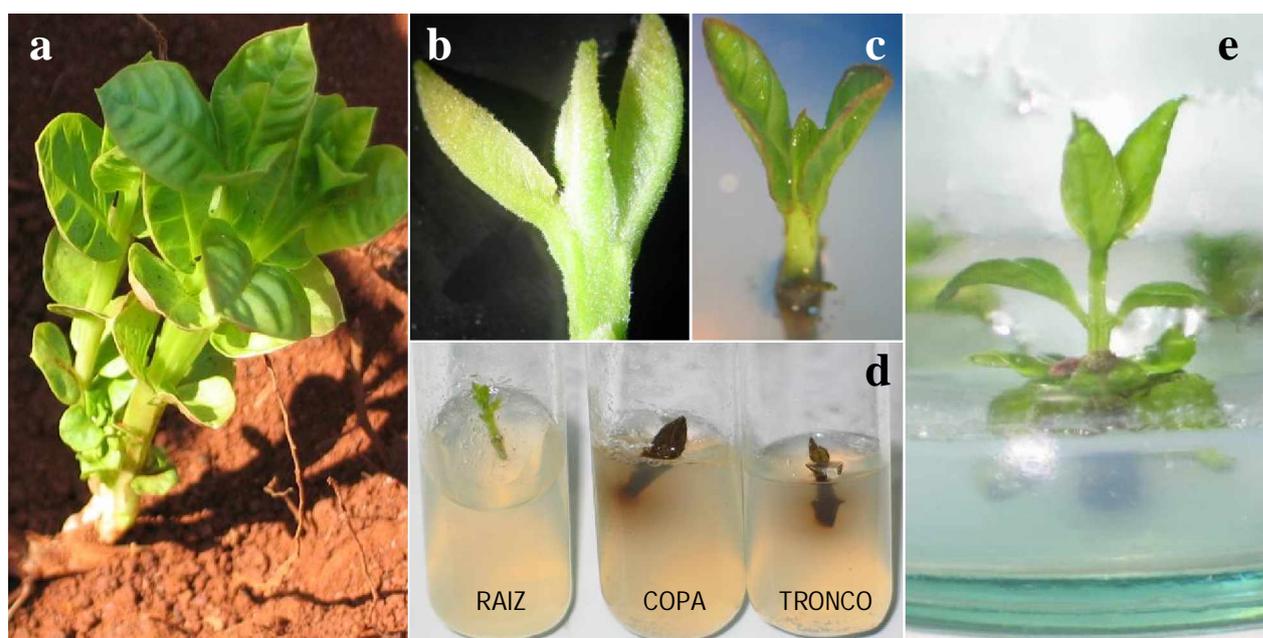


Figura 3. Características morfológicas de juvenilidad y comportamiento *in vitro* de los brotes de la raíz de árboles de campo de guayabo (*P. guajava*) cv. Enana Roja Cubana. a) Brotes de la raíz con un crecimiento vigoroso en condiciones de campo. b) Extremo apical del brote de la copa que muestra vellosidad en el envés de la hoja joven. c) Extremo apical de brote de la raíz sin pelos superficiales en hojas jóvenes. d) Ausencia de oxidación fenólica en los tejidos superficiales y de exudación de compuestos fenólicos al medio de cultivo en los brotes de la raíz en comparación con los brotes de la copa y el tronco. e) Favorable establecimiento *in vitro* de yemas de brotes de la raíz, a los 90 d de cultivo en medio MS + BAP 4.4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ + AIA 2.85 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

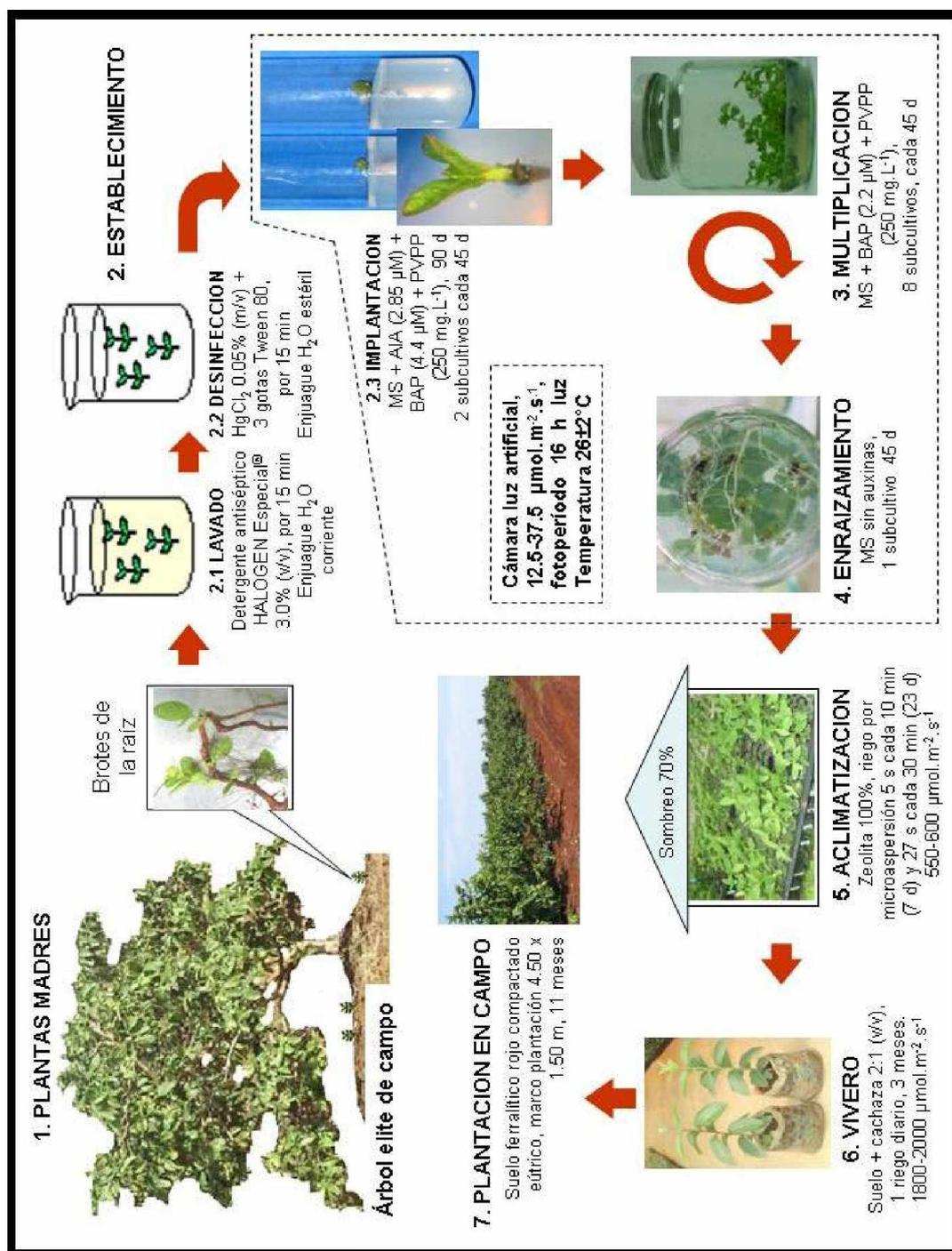


Figura 7. Esquema del protocolo para la regeneración de plantas *in vitro* por organogénesis a partir de yemas de brotes de la raíz de árboles de campo en el guayabo cv. Enana Roja Cubana.

Tabla 13. Efecto de la interacción del tipo y concentración de auxinas (2,4-D y Picloram), sobre la respuesta morfogénica de los embriones cigóticos inmaduros de guayabo, a los 60 d de iniciado el cultivo en la fase de inducción.

Factores y Niveles		Interacción (A x B)	^x Formación de:	
A: Tipo de auxina	B: Concentración ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)		callo primario (%)	callo con estructuras embriogénicas (%)
2,4-D	0.0	I	0.0 d	0.0 c
	5.0	II	84.0 a	44.0 a
	10.0	III	80.0 a	48.0 a
	15.0	IV	44.0 b	16.0 bc
	20.0	V	28.0 c	4.0 c
Picloram	0.0	VI	0.0 d	0.0 c
	5.0	VII	76.0 a	32.0 b
	10.0	VIII	68.0 ab	44.0 a
	15.0	IX	48.0 b	32.0 b
	20.0	X	20.0 c	8.0 c
Significación			*	*
EEx			4.91	3.05
CV			0.271	0.592

(Medias con letras desiguales difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA bifactorial y DHS de Tukey, para $p < 0.05$, EEx: error estándar de la media, CV: coeficiente de variación, ^x cada valor representa el promedio de cinco frascos de cultivo con cinco explantes cada uno).

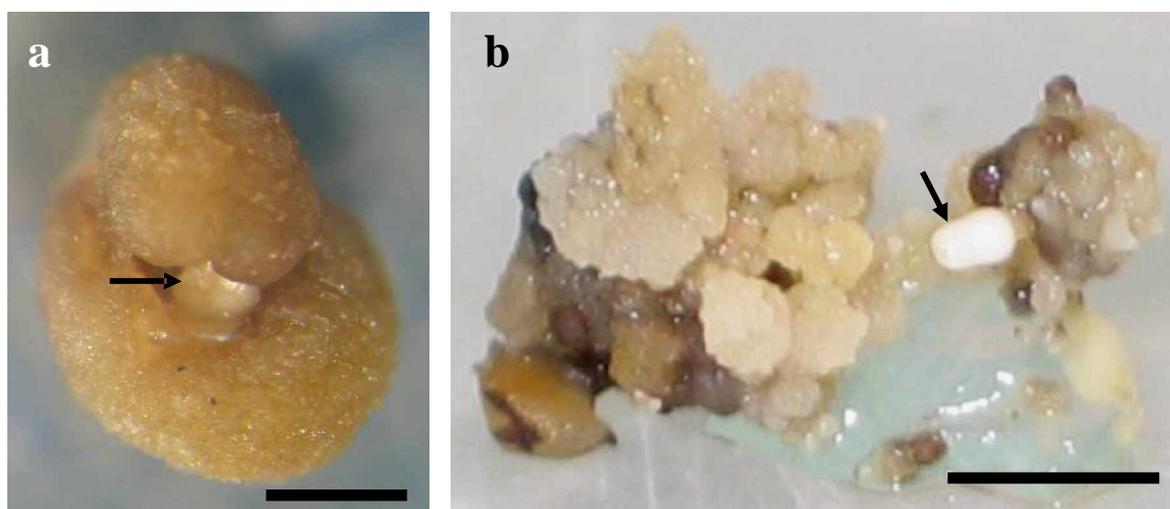


Figura 8. Principales características morfológicas de los callos obtenidos durante la inducción del proceso embriogénico a partir de embriones cigóticos inmaduros de guayabo (*P. guajava* L.). a) Callo primario, compacto, duro, de color pardo-amarillento originado directamente del explante inicial (flecha) durante los primeros 30 d de cultivo con 2,4-D $5.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$. b) Tejido o callo nodular, friable y de color beige que se originó sobre el callo primario, a los 50 d de cultivo en el mismo medio, donde se observó la formación de embriones somáticos aislados (flecha). (^a barra=0.5 mm; ^b barra=2.5 mm).

Tabla 15. Efecto de la concentración de 2,4-D sobre el crecimiento y potencial morfogénico, de los callos

con estructuras embriogénicas en el guayabo, después de tres subcultivos de 30 d cada uno en medio de proliferación.

Tres subcultivos de proliferación cada 30 d 2,4-D ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Incremento en masa fresca del callo con estructuras embriogénicas (mg)		Formación de embriones somáticos etapas avanzadas (%)		No. de embriones somáticos etapas avanzadas/explante inicial	
	^x Media	SR	^y Media	SR	^y Media	SR
2.5	278.26	12.6 c	36.0	9.0 ab	2.3	10.0 ab
5.0	577.19	26.6 b	24.0	5.5 b	1.5	6.0 b
7.5	624.03	34.4 a	20.0	7.0 b	1.5	3.5 b
testigo (sin subcultivos)	235.47	7.4 c	62.0	12.5 a	3.8	14.5 a
Significación	*		*		*	
EEx	18.70		2.76		0.63	
CV	0.09		0.58		0.56	

(Para SR con letras desiguales, las medias difieren significativamente según pruebas no-paramétricas de Kruskal Wallis y Student-Newman-Keuls, para $p < 0.05$, SR: suma de rangos, EEx: error estándar de la media, CV: coeficiente de variación, ^x cada valor representa el promedio de 20 callos, ^y cada valor representa el promedio de cuatro frascos de cultivo con cinco callos cada uno).

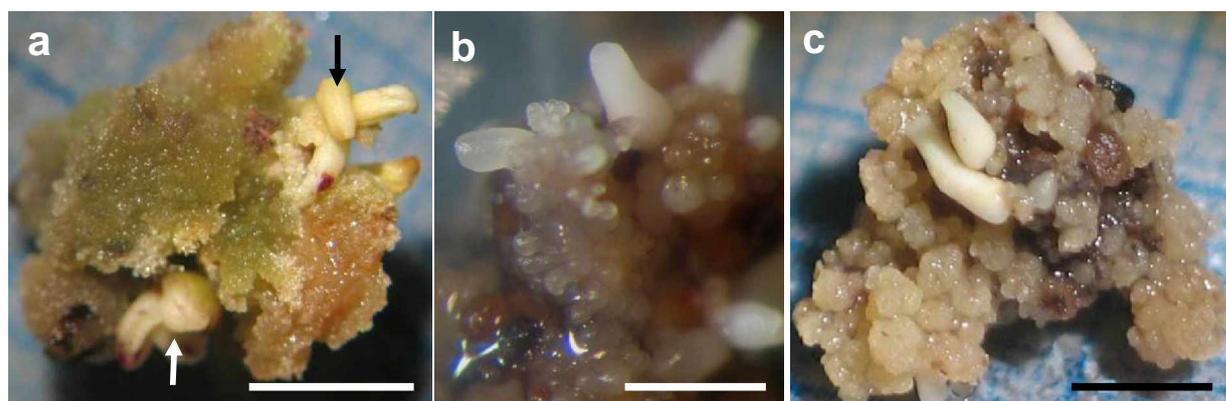


Figura 9. Principales características morfológicas de los callos durante la proliferación en medios de cultivo con diferentes concentraciones de 2,4-D, en el guayabo (*P. guajava* L.). a) Formación de un callo degenerado o no-embriogénico en el tratamiento testigo (sin subcultivos de proliferación) y desarrollo de embriones somáticos malformados (flechas). b) Vista aumentada de una porción superficial del callo con estructuras embriogénicas y embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo. c) Crecimiento normal del callo con estructuras embriogénicas y desarrollo de algunos embriones somáticos en la superficie del callo (2,4-D $7.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$). (^{a,c}barras=3 mm; ^bbarra=1 mm).

Tabla 16. Efecto de los factores concentración de sacarosa y concentración de ABA sobre la histodiferenciación del callo con estructuras embriogénicas, a los 60 d de cultivo.

Factores	Concentración	No. embriones somáticos / 100 mg callo con estructuras embriogénicas		
		Torpedo	Cotiledonar	Total (ambos tipos)
Sacarosa (g.L ⁻¹)	30.0	3.8 b	2.8 b	6.5 b
	60.0	4.6 a	3.6 a	8.2 a
Significación		*	*	*
EEx		0.30	0.35	0.62
N		90	90	90
ABA (μmol.L ⁻¹)	0.0	1.1 c	0.3 b	1.4 b
	5.0	3.2 b	0.9 b	4.1 b
	10.0	4.6 a	3.9 a	8.5 ab
	15.0	5.6 a	5.2 a	10.9 a
	20.0	5.2 a	4.3 a	9.5 a
	25.0	5.2 a	4.4 a	9.7 a
Significación		*	*	*
EEx		0.35	0.34	0.56
N		30	30	30
CV		0.174	0.186	0.108

(Medias con letras desiguales difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA bifactorial y DHS de Tukey, para $p < 0.05$, ns: no significativo, N: número de réplicas, EEx: error estándar de la media, CV: coeficiente de variación).

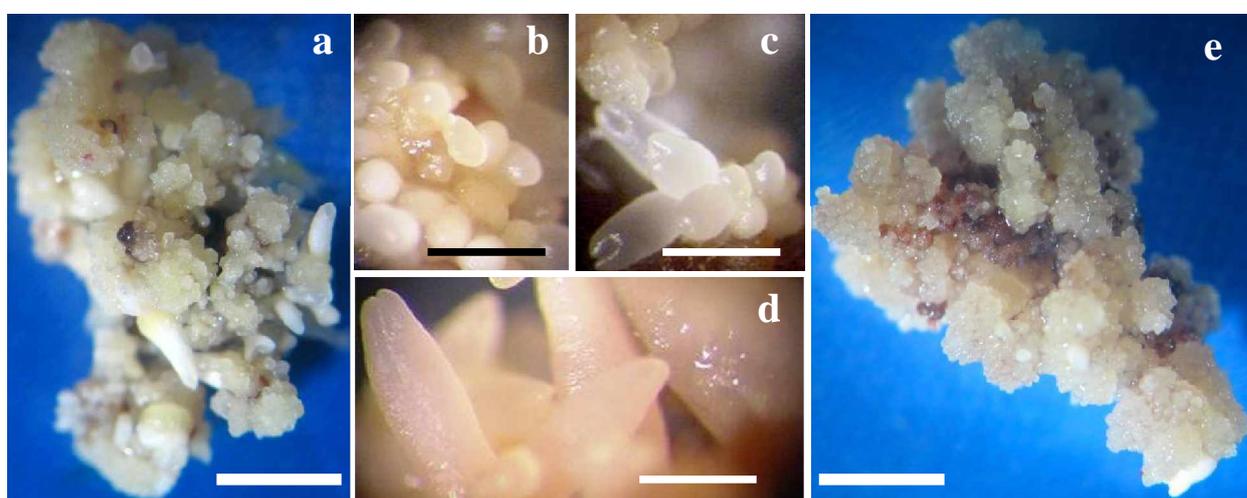


Figura 10. Histodiferenciación de embriones somáticos de guayabo (*P. guajava* L.). a) Vista general del callo con estructuras embriogénicas a los 30 d de cultivo en medio semisólido WPM con sacarosa 60 g.L⁻¹ y ABA 15 μmol.L⁻¹. b, c, d) Embriones somáticos en etapas globular, corazón-torpedo y cotiledonar respectivamente, a los 30 d de cultivo en medio semisólido MS sin reguladores del crecimiento. e) Vista del callo con menores cantidades de embriones somáticos en etapas avanzadas de desarrollo, a los 30 d de cultivo en medio semisólido WPM con sacarosa 30 g.L⁻¹ y sin ABA. (^{a,e}barras=3 mm; ^{b,c,d}barras=500 μm).

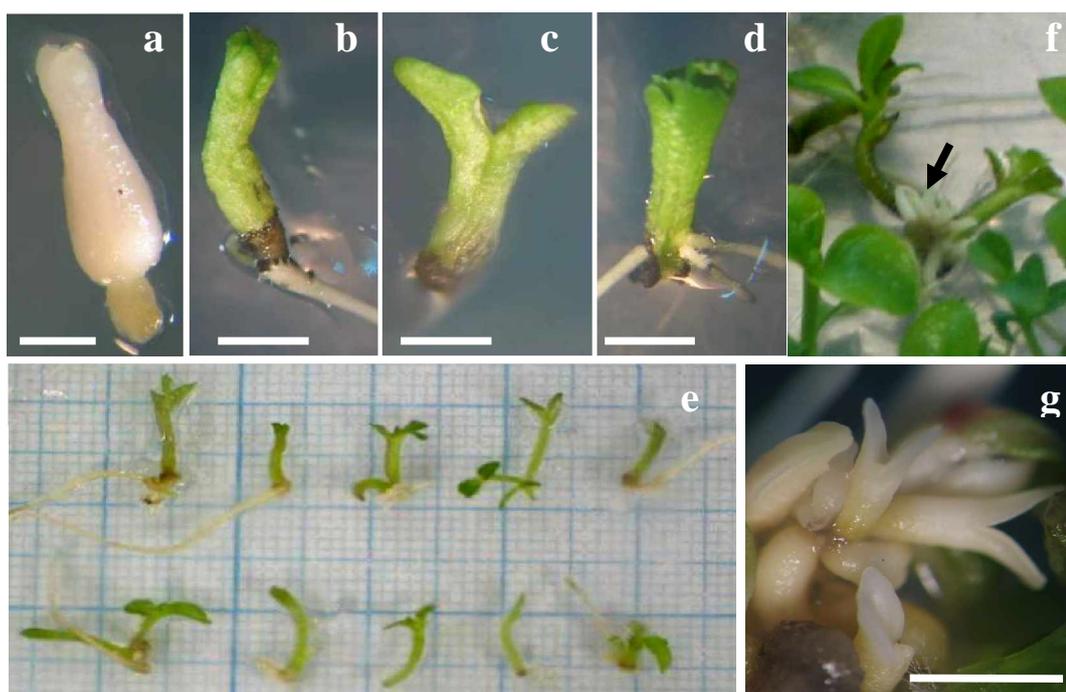


Figura 11. Germinación de embriones somáticos de guayabo (*P. guajava* L.) en medio semisólido MS 50% sin reguladores del crecimiento. a) Embrión somático en estado torpedo, aislado y listo para la germinación. b) Germinación normal. c) y d) Germinaciones fuera de tipo: crecimiento solo de hipocótilo y germinación sin raíz principal, respectivamente. e) Vista general de la germinación a los 30 d de cultivo. f) Formación de embriones secundarios (flecha). g) Detalle de un grupo o agregado de embriones somáticos secundarios. (^abarra=250 μ m; ^{b,c,d}barras=1 mm; ^ebarra = 3 mm).

Tabla 17. Efectos de los factores concentración de sacarosa y concentración de ABA, utilizadas en la histodiferenciación, sobre el proceso de germinación y formación de embriones secundarios en el guayabo, a los 30 d de cultivo en medio semisólido MS 50% sin reguladores del crecimiento.

Factores	Concentración	Germinación (%)		Formación de embriones secundarios (%)
		Total	Normal	
Sacarosa (g.L ⁻¹)	30.0	70.7	49.6 b	16.7 b
	60.0	74.1	59.3 a	22.9 a
Significación		ns	*	*
EEx		1.51	2.72	1.81
N		18	18	18
ABA (μ mol.L ⁻¹)	0.0	62.2 d	30.0 b	35.6 a
	5.0	68.9 c	43.3 b	25.6 ab
	10.0	71.1 bc	54.5 ab	16.7 bc
	15.0	81.1 a	68.9 a	17.8 bc
	20.0	78.9 a	67.8 a	12.2 c
	25.0	72.2 ab	62.2 ab	11.1 c
Significación		*	*	*
N		6	6	6
EEx		2.77	3.43	2.76
CV		0.125	0.180	0.369

(Medias con letras desiguales difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA bifactorial y DHS de Tukey, para $p < 0.05$, N: número de réplicas, EEx: error estándar de la media, CV: coeficiente de variación).

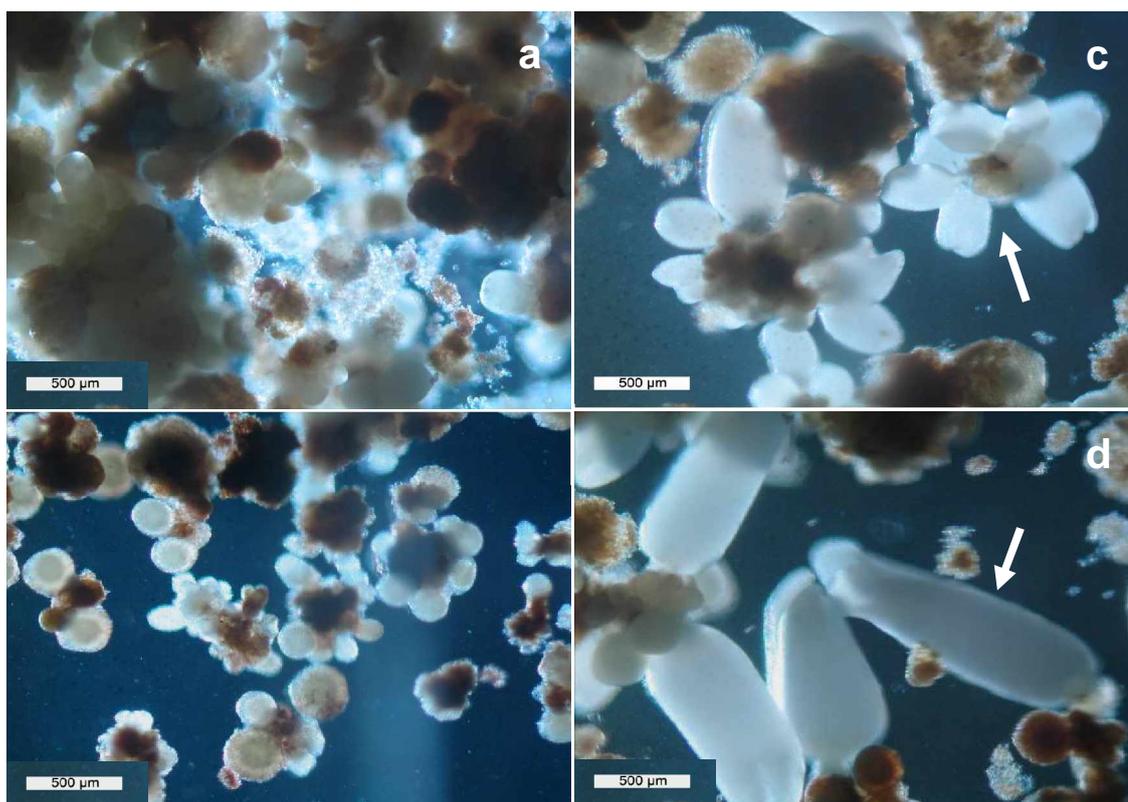


Figura 12. Embriogénesis somática de alta frecuencia en medio líquido en el guayabo (*P. guajava* L.). a) Suspensión celular heterogénea de agregados celulares y estructuras embriogénicas globulares, al inicio del cultivo en medio líquido en 2,4-D $7.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$. b) Diferenciación de embriones somáticos en etapas globular-oblongo en la fracción 250-500 μm , diferenciados en grupos unidos a un centro común o en la periferia de agregados celulares pro-embriogénicos. c) Crecimiento y desarrollo de los embriones somáticos a nuevas etapas ontogénicas, con predominio de grupos de embriones somáticos (flecha) de composición heterogénea en cuanto a las etapas de desarrollo. d) Embriones somáticos en etapa cotiledonar, los cuales por el efecto mecánico de la agitación del medio, se desprenden (flecha) del agregado principal donde fueron histodiferenciados.

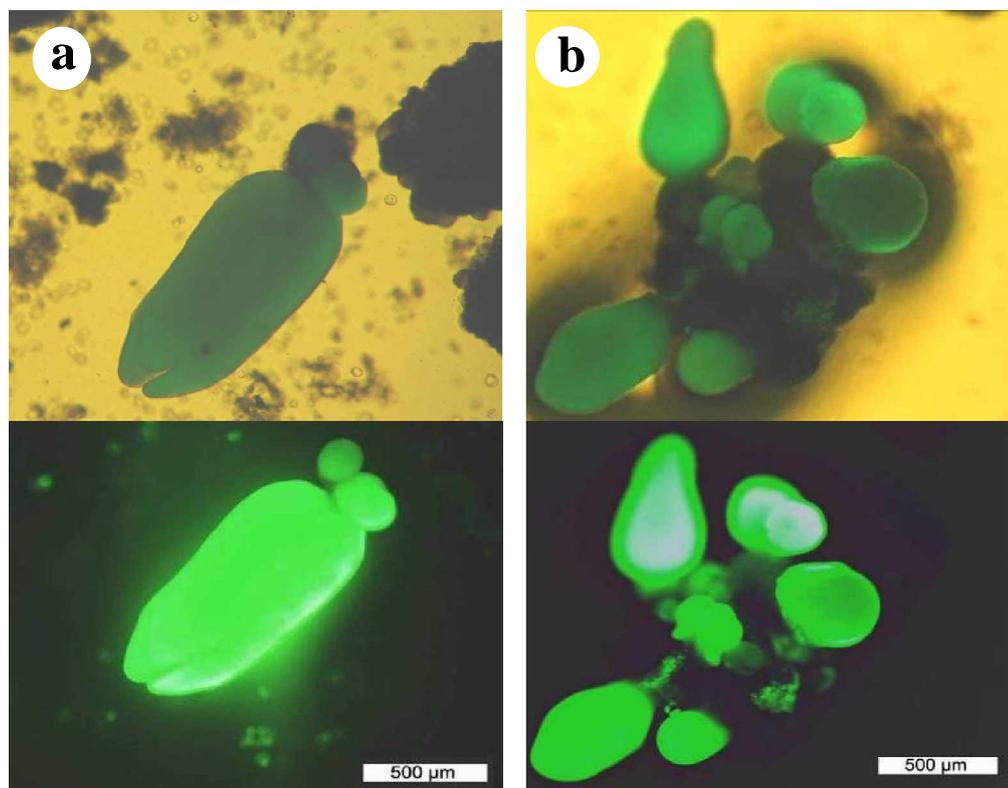


Figura 13. Análisis de viabilidad con FDA en campo claro y campo oscuro de los cultivos embriogénicos de guayabo (*P. guajava* L.) en medio líquido. a) Embrión somático en etapa torpedo, con embriones globulares en la base, agregados celulares y algunas células dispersas. b) Grupo o agregado de embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo, donde la matriz central o agregado celular que los sostiene, no flúorese al estímulo de la luz UV.

Tabla 19. Efecto del tipo de medio de cultivo (Líquido o Semisólido), utilizado para la histodiferenciación de los embriones somáticos, sobre la germinación *in vitro* y la conversión en plantas en condiciones *ex vitro* de aclimatización.

Medio de cultivo en la histodiferenciación	<i>In vitro</i>		<i>Ex vitro</i>	
	^x Germinación Total (%)	^x Germinación Normal (%)	^y Supervivencia (%)	^y Conversión (%)
Líquido	88.9	82.2 a	94.5	75.5 a
Semisólido	84.4	71.1 b	93.6	66.7 b
Significación	ns	*	ns	*
EEx	1.9	2.4	1.5	1.7
CV	0.09	0.13	0.07	0.10

(Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según prueba paramétrica de *t*-Student, para $p < 0.05$. ns: no significativo, EEx: error estándar de la media, CV: coeficiente de variación, ^xcada valor representa el promedio de tres placas de Petri, a razón de 15 embriones somáticos por placa, ^ycada valor representa el promedio de nueve repeticiones de 12 plántulas cada una).



Figura 14. Germinación *in vitro* y conversión en planta en condiciones *ex vitro* de los embriones somáticos torpedo-cotiledonar de guayabo (*P. guajava*). a) Embrión somático que muestra una germinación normal, con un buen desarrollo del brote caulinar y radicular. b) Altos porcentajes de supervivencia en uno y otro tratamiento (1 medio líquido y 2 medio semisólido) durante la aclimatización. c) Conversión en planta de los embriones somáticos de guayabo, en bolsas de nylon polietileno en la fase de vivero.