

MUPLICACIÓN DE SUSPENSIONES EMBRIOGÉNICAS DE *Psidium guajava* L.*

Jorge A. Vilchez Perozo¹, Nilca R. Albany de Vilchez², Leonardo Martínez Ferrer¹, Fernando Pliego Alfaro³, Carolina Sánchez Romero³ y Leyanis García Aguila⁴

RESUMEN

Las suspensiones embriogénicas constituyen un sistema de cultivo con una gran utilidad práctica ya que presentan tasas de multiplicación elevadas y permite la automatización y sincronización de los cultivos. En guayabo, la embriogénesis somática ha sido inducida a partir de diferentes explantes de origen juvenil. En esta especie, la proliferación de cultivos embriogénicos se realiza de forma exitosa en medio sólido, pero no se ha descrito su multiplicación como suspensiones embriogénicas. En el presente trabajo se investigó el establecimiento de suspensiones embriogénicas de guayabo (*Psidium guajava* L.), analizando el efecto del medio de cultivo y de diferentes densidades de inóculo. El aspecto de los cultivos fue mejor (embriones color crema y bien formados) en medio MS con sus macronutrientes a la mitad de concentración (MSm) que en el medio WPM (embriones de color amarillento y algunos agregados embriogénicos con aspecto necrótico), aunque no se apreciaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento, estimada por la variación del volumen de células sedimentadas (VCS). Respecto a la densidad celular inicial, aunque una densidad 2,5 % presentó valores de VCS menores al final del periodo de cultivo, dio lugar a un porcentaje de materia seca mayor que densidades de inóculo más elevadas. Los resultados demuestran la posibilidad de utilizar suspensiones para la proliferación de tejidos embriogénicos de guayabo, y se puede recomendar su establecimiento en medio MSm con una densidad de inóculo de 2,5 % VCS y el subcultivo cada 28 días, para favorecer la multiplicación de células y agregados embriogénicos.

Palabras clave adicionales: Densidad de inóculo, embriogénesis somática, guayabo, volumen de células sedimentadas

ABSTRACT

Multiplication of embryogenic suspensions of *Psidium guajava* L.

Embryogenic suspensions constitute a culture system with great practical utility as it presents high multiplication rates and allows culture automatization and synchronization. In guava, somatic embryogenesis has been initiated from different explants of juvenile origin. Although proliferation of embryogenic cultures has been successfully carried out in semisolid medium, using of embryogenic suspensions has not been reported. In this work, establishment of guava (*Psidium guajava* L.) embryogenic suspensions has been investigated by analyzing the effect of culture medium and different inoculum densities. For guava embryogenic suspensions, MS medium with macronutrients at half strength (MSm) was more appropriate than WPM medium. Better culture aspect was observed in this medium, although no significant differences were found related to growth rate, estimated by settled cell volume (SCV) variation. In relation to inoculum density, even though a density 2.5 % resulted in a lower SCV values at the end of the culture period, it gave rise to higher dry matter accumulation than higher inoculum densities. This work demonstrates the possibility of using suspensions for proliferation of guava embryogenic tissues, and initiation in MSm medium with an inoculum density of 2.5 % SCV and subculturing every 28 days may be recommended to enhance multiplication of cells and embryogenic aggregates.

Additional keywords: Inoculum density, guava, sedimented cell volume, somatic embryogenesis

INTRODUCCIÓN

El guayabo (*Psidium guajava* L.) representa uno de los frutales con mayores perspectivas de explotación nacional. Su fruto se ubica entre los

más populares y consumidos en el trópico y subtrópico (Kamle et al., 2013), debido a su valor nutricional y características organolépticas, destacando por su alto contenido en vitamina C y antioxidantes, entre otros beneficios para la salud

Recibido: Diciembre 26, 2022

Aceptado: Septiembre 22, 2023

* Este trabajo es parte de la tesis doctoral del primer autor en la Universidad de Córdoba, 2016.

¹Dpto. de Botánica, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

e-mail: jvilchezp@fa.luz.edu.ve; ljm80@gmail.com

²Dpto. de Química, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

e-mail: nalbany@fa.luz.edu.ve

³Dpto. de Botánica y Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos. Málaga, España. e-mail: ferpliego@uma.es; c.sanchez@uma.es (autor de correspondencia)

⁴Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Santa Clara. Villa Clara, Cuba. e-mail: leyanis@ibp.cu

(Singh, 2005; Aular y Casares, 2011). Estas características hacen del guayabo un cultivo tan interesante para la agroindustria y el agronegocio, que ha incrementado su demanda en los mercados nacionales e internacionales.

Sin embargo, en Venezuela el cultivo del guayabo presenta una baja productividad y calidad de la fruta debido a la aplicación incorrecta de prácticas hortícolas, el manejo heterogéneo de los huertos, bajas densidades de siembra y empleo de materiales criollos de bajo rendimiento (Aular y Casares, 2011). El uso de herramientas biotecnológicas, como la transformación genética o la variación somaclonal, puede ser de gran interés para la mejora de esta especie; sin embargo, como paso previo es necesario el desarrollo de métodos eficaces de regeneración, como la embriogénesis somática.

La embriogénesis somática es el proceso mediante el cual células somáticas se desarrollan a través de estados de la embriogenia para dar lugar a plantas completas sin fusión gamética (Zimmerman, 1993). La embriogénesis somática es una poderosa técnica de cultivo *in vitro* con múltiples aplicaciones en diferentes campos tales como la investigación básica, la mejora genética o la producción comercial de plantas (Sánchez, 2021).

Aunque la proliferación de los cultivos embriogénicos suele realizarse en medio sólido, también puede llevarse a cabo en medio líquido, como suspensiones embriogénicas que son iniciadas mediante inoculación de callo embriogénico friable en un medio líquido adecuado y mantenidas con agitación continua (Mustafa et al., 2011).

El cultivo en medio líquido favorece el contacto estrecho de los tejidos con el medio nutritivo (Soomro y Memon, 2007), lo cual permite un acceso más fácil y rápido a los nutrientes, reguladores de crecimiento y suplementos añadidos (Mustafa et al., 2011). De esta forma, el cultivo en suspensión aumenta la disponibilidad de los componentes del medio (Moscatiello et al., 2013) y mejora la absorción de los mismos (Ibrahim y Tresniawati, 2020). Por su parte, la agitación de los cultivos asegura el reparto uniforme de los componentes del medio de cultivo, evitando la formación de gradientes que tiene lugar en medio sólido (Kong et al., 2020). Además, la agitación aumenta la aireación, lo que

es especialmente importante en cultivos en los que los tejidos están sumergidos en el medio, como es el caso de las suspensiones celulares. También favorece la separación de las células y su mezcla con el medio de cultivo (Ibrahim y Tresniawati 2020). Asimismo, hay una reducción de los efectos negativos de las toxinas que normalmente son liberadas por los tejidos cultivados, debido a su dispersión y dilución en el medio de cultivo (Ascough y Fennell, 2004).

Gracias a estas circunstancias, las suspensiones embriogénicas constituyen un sistema de cultivo con tasas de multiplicación elevadas (Soomro y Memon, 2007) que presentan aplicaciones importantes porque se considera un método de cultivo ideal para la propagación clonal en masa y facilita la sincronización de los cultivos (Buffard et al., 1995), lo que representa una ventaja para la optimización de protocolos y la producción de explantes. Además, se consideran de gran utilidad para el establecimiento de modelos experimentales debido a la homogeneidad de los cultivos y a la posibilidad de manipular en tiempo real las condiciones del ensayo (Wang et al., 1999), constituyen el punto de partida para la aplicación de diversas herramientas biotecnológicas, como la transformación genética, el aislamiento de protoplastos o la edición génica (Márquez et al., 2012), y posibilita la automatización del cultivo mediante el uso de biorreactores, con la consiguiente reducción de los costes de producción (Santacruz y Portillo, 2009).

En guayabo, la embriogénesis somática fue inducida por primera vez por Gaffoor y Alderson (1994) a partir de embriones cigóticos. Posteriormente, diferentes autores han inducido este proceso a partir de embriones cigóticos inmaduros de diferentes variedades (Vilchez et al., 2002; Vilchez y Albany, 2015; Kamle y Baek, 2017). Los protocolos de embriogénesis somática de guayabo reportan el empleo de medios semisólidos de cultivo; sin embargo, no se ha descrito el establecimiento de suspensiones embriogénicas (Kamle y Baek, 2017).

El establecimiento de suspensiones embriogénicas requiere la optimización de factores de distinto tipo, entre los que se consideran determinantes el medio de cultivo y la densidad de inóculo (Kong et al., 2020).

El objetivo de la presente investigación fue aportar información novedosa con relación al

medio nutritivo y la densidad de inóculo para el cultivo en suspensión de tejido embriogénico de guayabo, estudiando el efecto de estos factores sobre el crecimiento y proliferación de suspensiones embriogénicas de esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología "Prof. Silvia León de Sierralta", Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia (Venezuela).

Embriogénesis somática. La embriogénesis somática se indujo a partir de embriones cigóticos inmaduros de guayabo (*Psidium guajava* L.) cv. Enana Roja Cubana EEA-1840, siguiendo el protocolo descrito por Vilchez et al. (2002). Tras la esterilización de los frutos, embriones en etapa torpedo y cotiledonar, con una longitud de 0,18 a 1,30 mm, fueron separados del saco embrionario y cultivados en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de L-glutamina, $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido ascórbico, $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa y $2,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Phytigel (Sigma-Aldrich, St. Louis). Los cultivos embriogénicos obtenidos en la fase de inducción se mantuvieron en medio MS suplementado con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D, $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de L-glutamina, $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa y $2,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Phytigel, con subcultivo a medio fresco cada 6 semanas. Los cultivos se incubaron a $28 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ en condiciones de oscuridad.

El pH de todos los medios de cultivo se ajustó a 5,8 con hidróxido de sodio 1N y ácido clorhídrico 1N antes de su esterilización en autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ y $1,2 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ durante 20 min.

Establecimiento de suspensiones celulares. Las suspensiones embriogénicas de guayabo se establecieron utilizando como material de partida callo con estructuras embriogénicas, al que se le habían eliminado los embriones somáticos en estado torpedo, torpedo-elongado y cotiledonar visibles superficialmente. En matraces Erlenmeyer de 25 mL se inocularon $25 \pm 0,5 \text{ mg}$ de callo con estas características. Seguidamente, para promover la separación de las estructuras embriogénicas del callo, se añadieron 3 mL de medio líquido de la misma composición que el utilizado para el inicio, es decir, medio MS suplementado con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D, $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de L-glutamina, $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido ascórbico y

$60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa. El medio de cultivo fue renovado cada 10 días, ajustando progresivamente su volumen hasta alcanzar 5 mL. Con el fin de obtener suficiente tejido embriogénico para realizar los diferentes ensayos, ocho semanas después de su inicio, se unificó el material obtenido en ocho suspensiones.

Las suspensiones embriogénicas se incubaron en un agitador orbital a 90 rpm, a una temperatura de $28 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ y oscuridad constante.

Efecto del medio de cultivo sobre la multiplicación de suspensiones embriogénicas de guayabo. En un primer experimento se investigó el efecto del medio de cultivo sobre la proliferación de suspensiones embriogénicas de guayabo, evaluando el medio MS con sus macronutrientes a la mitad de concentración (MSm) y el medio Woody Plant Medium (WPM) (McCown y Lloyd, 1981). En ambos casos, los medios fueron suplementados con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D; $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de L-glutamina, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido ascórbico y $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa. Para esto, se iniciaron suspensiones embriogénicas mediante inoculación de 2 mL de células sedimentadas en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 20 mL de medio de cultivo. Se realizaron tres réplicas por tratamiento.

Cada 14 días, durante un periodo de ocho semanas, se midió el crecimiento de las suspensiones, el volumen de medio consumido y el contenido de sacarosa.

El crecimiento de las suspensiones se determinó de forma no invasiva midiendo el VCS a lo largo del tiempo. La medición se realizó volcando el contenido de las suspensiones celulares sobre un tubo cónico graduado para luego dejarlo decantar durante 2 min antes de proceder a medir el volumen ocupado por las células y agregados celulares. Para medir el volumen de medio consumido, el contenido de las suspensiones se transfirió a un tubo cónico graduado y se dejó decantar durante 2 min, seguidamente se midió el medio de cultivo de la suspensión y se restó este valor a los 20 mL con que se iniciaron las suspensiones. Posteriormente, se adicionó medio de cultivo fresco hasta completar los 20 mL para la siguiente evaluación.

El contenido de sacarosa en el medio de cultivo se midió a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ en una muestra de $10 \text{ }\mu\text{L}$ de medio, utilizando un refractómetro Reichert digital. De acuerdo con Adelberg y Toler (2004) y

Adelberg (2005), esta medición permite obtener un índice relativo que puede utilizarse para estimar el consumo de sacarosa y comparar entre tratamientos en ensayos bajo condiciones controladas.

Efecto de la densidad de inóculo sobre el crecimiento de suspensiones embriogénicas de guayabo. Con base en los resultados del ensayo anterior, para investigar el efecto de la densidad de inóculo sobre el crecimiento de suspensiones embriogénicas de guayabo se utilizó el medio de cultivo MSm suplementado con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D, $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de L-glutamina, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido ascórbico y $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa.

En matraces Erlenmeyer de 50 mL con 15 mL de medio de cultivo, se inocularon tres VCS distintos: 2,5; 5,0 y 10,0 %. Se iniciaron cuatro suspensiones por tratamiento y el medio de cultivo no se renovó durante los 35 días del ensayo.

Cada siete días, se midió el VCS y el contenido de sacarosa, tal y como se indicó en el experimento anterior. Además, al final del periodo de cultivo se midió el porcentaje de materia seca por procedimiento estándar a partir de 2 mL de suspensión embriogénica, tras centrifugación a 6000 rpm durante 3 min y eliminación del sobrenadante. Se consideró que la muestra estaba seca luego de ser colocada en estufa a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 h. Se realizaron cuatro réplicas por tratamiento.

Técnicas de procesamiento y análisis de datos. El efecto del medio de cultivo y de la densidad de inóculo sobre las variables respuesta se analizó a través de las curvas de las variables VCS, volumen de medio consumido y contenido de sacarosa en el medio de cultivo, a lo largo del tiempo. El efecto de la densidad de inóculo sobre el porcentaje de materia seca se analizó estadísticamente mediante un diseño de experimento aleatorizado.

El procesamiento de los datos se realizó utilizando el software analítico Statistix versión 8.0. Una vez comprobada la distribución normal de los datos mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, se determinó el nivel de significación de los efectos del factor de estudio mediante análisis de la varianza y comparación de medias mediante la prueba de Tukey a un nivel de significación del 5 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del medio de cultivo sobre la multiplicación de suspensiones embriogénicas de guayabo. La friabilidad de los callos embriogénicos utilizados para el establecimiento de las suspensiones celulares (Figura 1 a, b) permitió su rápida disgregación en medio líquido, dando lugar a suspensiones embriogénicas heterogéneas. En estas suspensiones se observaron células dispersas y agregados celulares de diferentes tamaños, con o sin embriones somáticos globulares en su superficie, así como algunos embriones globulares aislados, dispersos en el medio de cultivo (Figura 1 c). A partir de los 28 días de cultivo, se apreció la formación de conglomerados de estructuras redondeadas de color blanco-opaco y superficie lisa, que se identificaron como embriones somáticos en etapa globular (Figura 1 d,e).

Se observó la presencia de embriones en diferentes estadios de desarrollo, lo cual constituye un inconveniente desde el punto de vista práctico, ya que la homogeneidad de los cultivos puede contribuir a una optimización más adecuada de las condiciones de crecimiento. Además, estructuras embriogénicas en estados de desarrollo precisos son normalmente requeridas para la aplicación de herramientas biotecnológicas. No obstante, de acuerdo con Kong et al. (2020), las células individuales raramente prevalecen en las suspensiones embriogénicas, ya que normalmente proliferan rápidamente dando lugar a pequeños agregados de tejido embriogénico.

Aunque los medios de cultivo evaluados se suplementaron con $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido ascórbico, fue visible el oscurecimiento de los mismos y de los agregados celulares o fragmentos de callo de mayor tamaño. Un oscurecimiento similar ha sido descrito en suspensiones celulares de *Eucalyptus cinerea* (Orozco et al., 2002), *Piper solmsianum* (Balbuena et al., 2009) y *Persea americana* (Márquez et al., 2012).

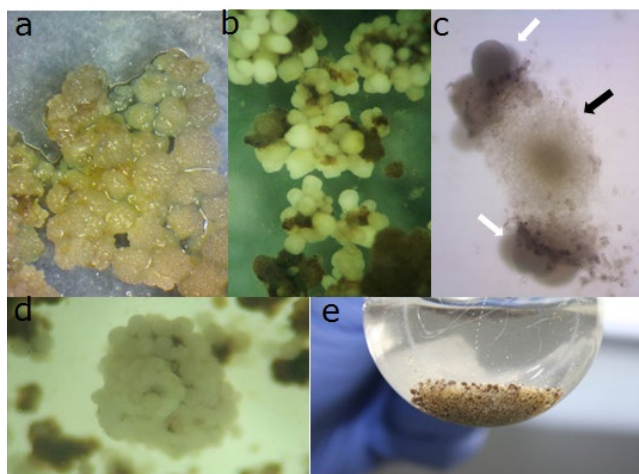


Figura 1. Establecimiento de suspensiones embriogénicas de guayabo cv. Enana Roja Cubana EEA-1840. a) Suspensión embriogénica en medio de cultivo MSm. b) Suspensión embriogénica en medio de cultivo WPM. c) Agregado celular embriogénico (flecha negra) con embriones somáticos en etapa globular sobre la superficie (flechas blancas). d) Conglomerados de embriones somáticos en etapa globular. e) Aspecto general de las suspensiones embriogénicas después de 56 días de cultivo en medio MSm

El crecimiento de las suspensiones embriogénicas de guayabo se ajustó a una curva sigmoideal, sin diferencias estadísticas ($P > 0,05$) entre ambos medios de cultivo (Figura 2). Comportamientos similares han sido observados en suspensiones embriogénicas de maní (Durham y Parrott, 1993), palmera datilera (Al-Khayri y Naik, 2018), aguacate (Márquez et al., 2012) y banana (Jalil et al., 2003). Aunque las curvas de crecimiento en medio MSm y WPM presentaron mucha similitud, al final del periodo de crecimiento se obtuvo una mejor apariencia de los cultivos en el medio MSm (embriones color crema claro y bien formados).

El medio de cultivo más adecuado depende del genotipo (Mustafa et al., 2011) y del proceso de desarrollo que se pretende llevar a cabo *in vitro* (Perán et al., 2004). No obstante, el medio MS es el más comúnmente utilizado para el cultivo de células y tejidos vegetales (George y De Klerk, 2008) y, de hecho, se emplea en suspensiones embriogénicas de palma aceitera (de Touchet et al., 1991) y aguacate (Márquez et al., 2012). La sacarosa constituye uno de los componentes normalmente incluidos en los medios de cultivo. Además de constituir la principal fuente de carbono en el proceso embriogénico (Blanc et al., 1999), actúa como regulador osmótico en el medio

de cultivo (Witjaksono y Litz, 1999; Mauri y Manzanera, 2003), lo cual le confiere una gran importancia en la embriogénesis somática *in vitro* (von Arnold et al., 2008). En *Morinda citrifolia*, Baque et al. (2012) observaron que una concentración inicial de sacarosa alta ($60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) condujo a una acumulación elevada de biomasa sin una fase estacionaria clara, de forma similar a lo observado en el presente trabajo.

Como era de esperar, a medida que transcurrió el periodo de evaluación se observó una tendencia al consumo del medio de cultivo (Figura 3), así como una disminución del contenido de sacarosa (Figura 4).

Efecto de la densidad de inóculo sobre el crecimiento de suspensiones embriogénicas de guayabo. La dinámica de crecimiento de suspensiones embriogénicas de guayabo cv. Enana Roja Cubana EEA 1840 varió dependiendo de la densidad de inóculo (Figura 5), tal y como ha sido descrito en otras especies (Bhojwani y Razdan, 1996). La densidad de 2,5 % de VCS se duplicó a los 14 días de cultivo, no observándose claramente una fase de desaceleración del crecimiento celular (Szabados et al., 1991). En la densidad de 5 % de VCS, el volumen inicial de células se duplicó entre los 14 y 21 días. Entre los 28 y 35 días se observó una fase de desaceleración progresiva. La

curva de VCS con la densidad de 10 % presentó una mayor pendiente y a los 21 días de cultivo se duplicó el volumen inicial de células. De acuerdo con Kong et al. (2020), se observó que bajas

densidades de inóculo dieron lugar a fases *lag* más largas, mientras que densidades de inóculo elevadas resultaron en un adelanto de la fase estacionaria

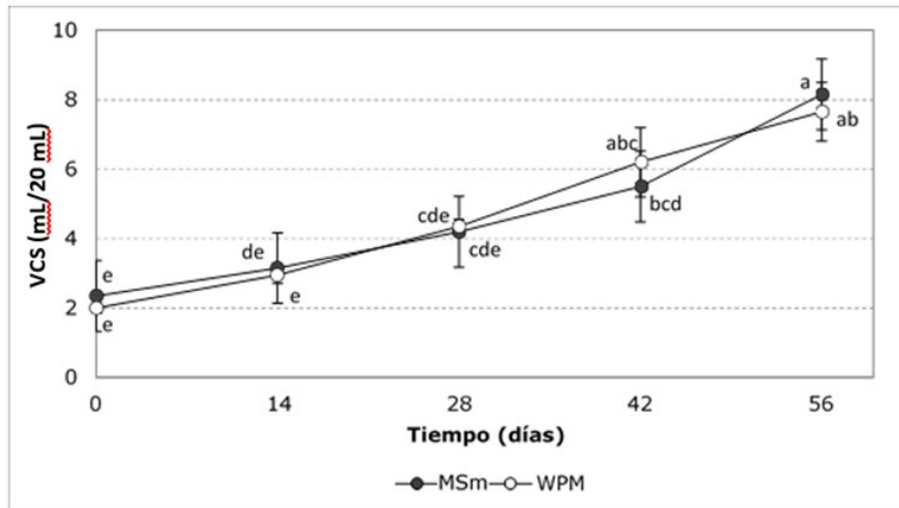


Figura 2. Volumen de células sedimentadas (VCS) en suspensiones embriogénicas de guayabo cv. Enana Roja Cubana EEA-1840, en medio líquido MSm y WPM. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$)

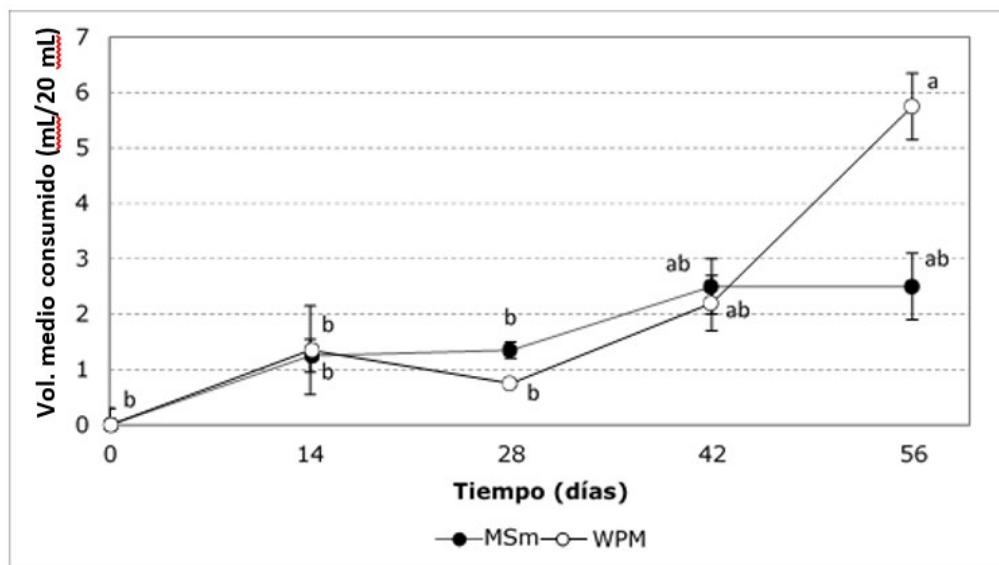


Figura 3. Volumen de medio consumido en suspensiones embriogénicas de guayabo cv. Enana Roja Cubana EEA-1840, en medio líquido MSm y WPM. Los datos representan la media \pm error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$)

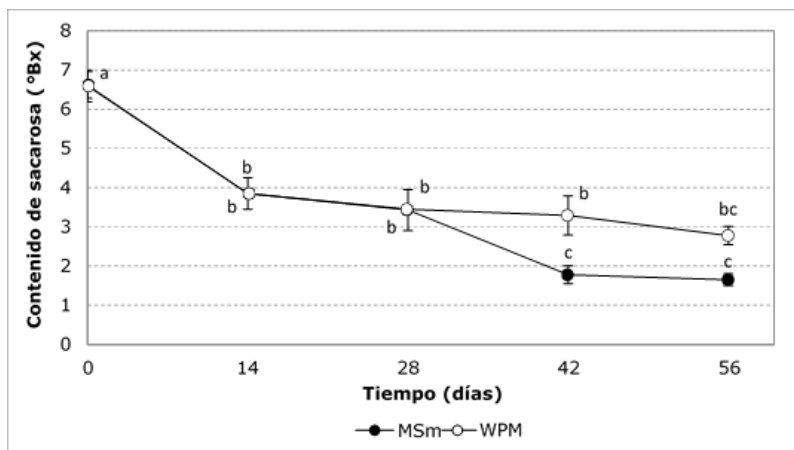


Figura 4. Contenido de sacarosa en el medio de cultivo de suspensiones embriogénicas de guayabo cv. Enana Roja Cubana EEA-1840 en medio MSm y WPM. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$). Cuando no se observan, los círculos negros coinciden con los blancos

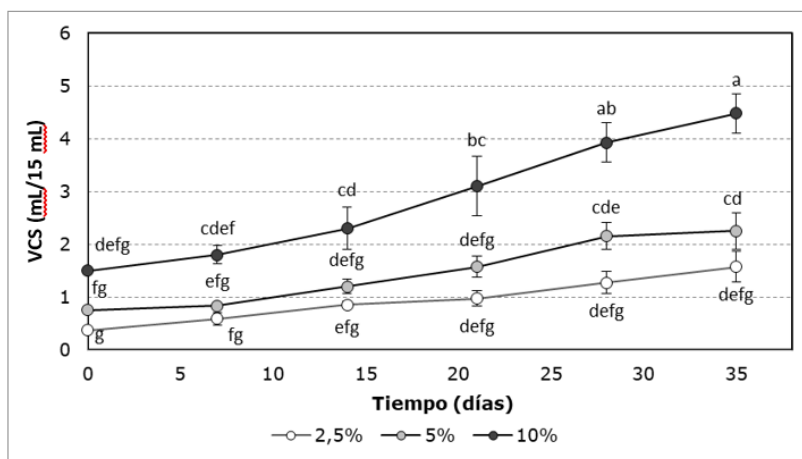


Figura 5. Efecto de la densidad de inóculo (VCS) en la dinámica de crecimiento de suspensiones embriogénicas de guayabo cv. Enana Roja Cubana EEA-1840. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

En todas las densidades evaluadas se observó que las suspensiones fueron de color crema en las primeras etapas de crecimiento (Figura 6 a), pero después de 21 días fue visible el oscurecimiento del medio de cultivo y de algunos agregados celulares. Este oscurecimiento fue incrementándose con el tiempo (Figura 6 b). A partir de los 28 días, se observó la diferenciación de embriones somáticos (Figura 6 c) y al final del periodo de evaluación, se apreciaron embriones en etapas avanzadas de desarrollo, incluyendo embriones con desarrollo del eje radicular (Figura 6 d).

La densidad de inóculo es un factor crucial al establecer cultivos en suspensión, debido a la existencia de interacciones entre células y entre las células y el medio de cultivo, que afectan al ambiente biológico de los cultivos (Ozeki y Komamine, 1985). Así, la densidad de inóculo óptima para el cultivo de células en suspensión puede variar para cada especie (Lo et al., 2012), habiéndose demostrado que es uno de los parámetros de cultivo que determina el comportamiento de las suspensiones celulares (Salaj et al., 2007; Barranco et al., 2009) y su

evolución en fases posteriores de la embriogénesis somática (Márquez et al., 2012).

En el presente trabajo se observó un aumento progresivo del VCS, con proliferación de células y agregados embriogénicos en todos los tratamientos, lo que puso de manifiesto que las densidades celulares estudiadas se situaban por encima de la densidad de inóculo crítica, valor por debajo del cual no existe crecimiento. No obstante, en la densidad de 2,5 % no se apreció una fase exponencial definida, lo que podría ser atribuido a una densidad celular demasiado baja (Barranco Olivera et al., 2009).

Por su parte, se encontró que la densidad de 2,5 % de VCS fue la que generó la mayor eficiencia en la producción de biomasa al final del cultivo, ya que dio lugar a un porcentaje de materia seca significativamente más alto (Cuadro 1).

Bajas concentraciones de inóculo se consideran a menudo beneficiosas porque en densidades de inóculo elevadas las células embriogénicas pueden empezar a deteriorarse; o las no embriogénicas que crecen más rápidamente, pueden restringir el crecimiento y proliferación de las células embriogénicas (Ibaraki et al., 2000). El efecto negativo que altas densidades de inóculo tienen

sobre la embriogénesis somática se ha observado diferentes cultivos. En vid, Mães et al. (1997) propusieron que el papel decisivo de la densidad de inóculo podría deberse a su influencia sobre la secreción de proteínas extracelulares con un papel regulador en el proceso embriogénico. En café y zanahoria se ha apuntado que la inducción de la embriogénesis somática podría estar regulada por sustancias presentes en el medio de cultivo, como las glicoproteínas (González et al., 2011).

Por lo tanto, el establecimiento de la densidad celular mínima es un aspecto importante al estudiar suspensiones embriogénicas, la cual suele determinarse experimentalmente en función de la influencia de la línea celular, los constituyentes del medio de cultivo y la tasa de crecimiento celular (Kong et al., 2020).

El contenido de sacarosa en los medios de cultivo fue disminuyendo a medida que las suspensiones celulares proliferaron (Figura 7), y se observó un aumento de la pendiente negativa a partir de los 14 días. Esto podría corresponderse con el inicio de la fase exponencial de crecimiento, en la que el cultivo requiere un mayor aporte de carbono y otros nutrientes para la síntesis de biomasa (Baque et al., 2012).

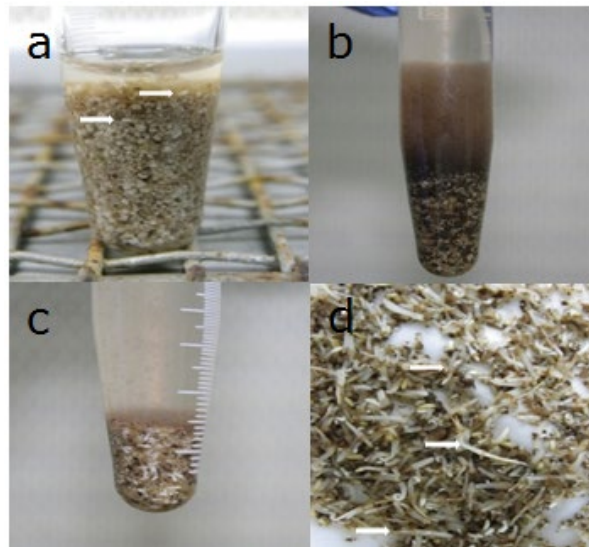


Figura 6. Características generales de suspensiones embriogénicas de guayabo cv. Enana Roja Cubana EEA-1840. a) Suspensiones embriogénicas entre los 7 y 21 días de cultivo, en las que se aprecia la formación de estructuras embriogénicas individuales y la diferenciación de embriones somáticos (flechas blancas). b) Suspensiones embriogénicas después de 21 días de cultivo, en las que se observa el oscurecimiento del medio de cultivo. c) Diferenciación de embriones somáticos. d) Embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo al final del ensayo. Las flechas blancas indican embriones somáticos con desarrollo del eje radicular.

Cuadro 1. Efecto de la densidad de inóculo sobre el porcentaje de materia seca en suspensiones celulares embriogénicas de guayabo cv. Enana Roja Cubana a los 35 días de cultivo

Densidad de inóculo (%)	2,5	5,0	10,0
Materia seca (%)	29,48 a	19,23 b	15,98 b

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente para la prueba Tukey ($P \leq 0,05$) de comparación de medias

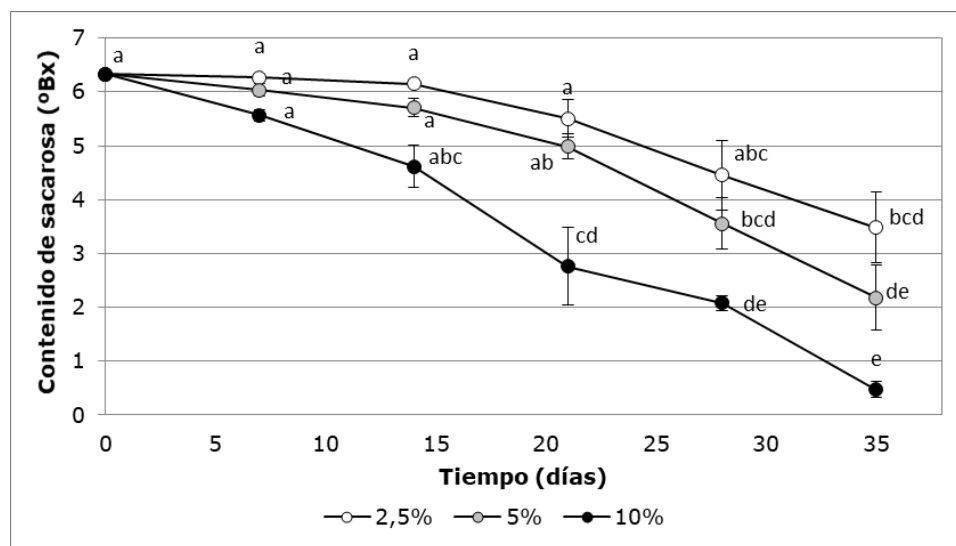


Figura 7. Contenido promedio de sacarosa en los medios de cultivo de suspensiones embriogénicas de guayabo cv. Enana Roja Cubana EEA-1840 iniciadas con diferentes densidades celulares. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$)

No se observó una ralentización en la disminución del contenido de sacarosa en el medio de cultivo, que podría estar relacionado con el inicio de la fase de desaceleración. En esta fase, la alta proliferación de células determina que se acumulen desechos del metabolismo celular, el pH se modifique, la transferencia de energía disminuya, se obstaculicen mutuamente las células y la velocidad de división disminuya gradualmente hasta dar inicio a la fase estacionaria, que puede coincidir con el momento en que se hayan agotado los nutrientes, o al menos algunos de ellos (Barranco et al., 2009). Por su parte, un menor contenido de sacarosa en el medio de cultivo probablemente pudo contribuir a reducir el factor estresante necesario para la inducción de embriogénesis (Karami y Saidi, 2010), favoreciendo la diferenciación de embriones.

CONCLUSIONES

Se logró multiplicar suspensiones embriogénicas de guayabo, derivadas de embriones cigóticos del cv. Enana Roja Cubana EEA-1840, en los medios de cultivo MSm y WPM. El medio MSm se mostró más adecuado ya que las estructuras formadas eran de color beige claro, sin masas embriogénicas necrosadas, aunque no se apreciaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento, estimada por la variación del VCS.

Se demostró que una densidad de inóculo de 2,5 % daba lugar a una mayor acumulación de materia seca que densidades más elevadas. Para favorecer la proliferación de células y agregados embriogénicos, los cultivos iniciados con esta densidad se deben subcultivar cada 28 días.

Los resultados demuestran la posibilidad de utilizar suspensiones para la proliferación de

tejidos embriogénicos de guayabo. No obstante, sería conveniente la realización de estudios adicionales con el fin de reducir el oscurecimiento del medio de cultivo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el cofinanciamiento de esta investigación al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad del Zulia y a la Misión Ciencia del Ministerio de Ciencia y Tecnología del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

LITERATURA CITADA

- Al-Khayri, J.M. y P.M. Naik. 2018. Biomass accumulation and polyphenols quantification in cell suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 54: S117-S118.
- Aular, J. y M. Casares. 2011. Consideraciones sobre la producción de frutas en Venezuela. *Revista Brasileira de Fruticultura (Jaboticabal)* E: 187-198.
- Ascough, G.D. y C.W. Fennell. 2004. The regulation of plant growth and development in liquid culture. *South African Journal of Botany* 70: 181-190.
- Balbuena, T.S., C. Santa-Catarina, V. Silveira, M.J. Kato y E.I.S. Floh. 2009. *In vitro* morphogenesis and cell suspension culture establishment in *Piper solmsianum* C. DC. (Piperaceae). *Acta Botanica Brasilica* 23(1): 274-281.
- Baque, M.A., A. Elgirban, E.J. Lee y K.Y. Paek. 2012. Sucrose regulated enhanced induction of anthraquinone, phenolics, flavonoids biosynthesis and activities of antioxidant enzymes in adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* (L.). *Acta Physiologiae Plantarum* 34(2): 405-415.
- Barranco-Olivera, L.A., R. Gómez-Kosky, M. Reyes-Vega, L. Posada-Pérez, M. Freire-Seijo y I. Herrera-Ofarrill. 2009. Efecto de la densidad de inóculo en la multiplicación y diferenciación de suspensiones celulares embriogénicas en el cultivo híbrido de banano FIHA-18 (*Musa* spp. AAAB). *Revista Colombiana de Biotecnología* 11(2): 40-47.
- Blanc, G., N. Michaux-Ferrière, C. Teisson, L. Lardet y M. P. Carron. 1999. Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 59: 103-112.
- Bhojwani, S.S. y M.K. Razdan. 1996. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Elsevier, Amsterdam.
- Buffard-Morel, J., J.L. Verdeil, S. Dussert, C. Magnaval, C. Huet y F. Grosdemange. 1995. Initiation of somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.). *In: C. Oropeza, F.W. Howard y G.R. Ashburner (eds.). Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects*. Springer. Dordrecht, The Netherlands. pp 217-223.
- de Touchet, B., Y. Duval y C. Pannetier. 1991. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell Reports* 10: 529-532.
- Durham, R. E. y W.A. Parrott. 1993. Repetitive somatic embryogenesis from peanut cultures in liquid medium. *Plant Cell Reports* 11(3): 122-125.
- Gaffoor, A. y P.G. Alderson. 1994. Somatic embryogenesis in guava (*Psidium guajava* L.). *In: P.J. Lumsden, J.R. Nicholas y W.J. Davies (eds.). Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*. Springer. Dordrecht, The Netherlands. pp. 272-277.
- George, E.F. y G.J. De Klerk. 2008. The components of plant tissue culture media I: macro- and micro-nutrients. *In: E.F. George, M.A. Hall y G.J. De Klerk (eds.). Plant Propagation by Tissue Culture: the Background*, 3rd ed. Springer. Dordrecht, The Netherlands pp. 65-113
- González-Vega, M.E., Y. Castilla-Valdés y A. Hernández-Rodríguez. 2011. Obtención de suspensiones celulares y embriones somáticos. *Revista Colombiana de Biotecnología* 13: 123-131.
- Ibaraki, Y., R. Matsushima y K. Kurata. 2000. Analysis of morphological changes in

- carrot somatic embryogenesis by serial observation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 61: 9-14.
16. Ibrahim, M.S.D. y C. Tresniawati. 2020. Evaluation of arabica coffee propagation using cell suspension culture. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 418: 012013
 17. Jalil, M., N. Khalid y R.Y. Othman. 2003. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75: 209-214.
 18. Kamle, M., P. Kumar, A. Bajpai, S. Kalim y R. Chandra. 2013. Assessment of genetic fidelity of in vitro regenerated guava (*Psidium guajava* L.) plants using DNA based markers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 42(1): 1-9.
 19. Kamle, M. y K.H. Baek. 2017. Somatic embryogenesis in guava (*Psidium guajava* L.): current status and future perspectives. *Biotech*. 7(3): 203
 20. Karami, O. y A. Saidi. 2010. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Molecular Biology Reports* 37(5): 2493-2507.
 21. Kong, E.Y.Y., J. Biddle, M. Foale y S.W. Adkins. 2020. Cell suspension culture: A potential in vitro culture method for clonal propagation of coconut plantlets via somatic embryogenesis. *Industrial Crops and Products* 147: 112125.
 22. Lo, K., B.J. Nadali y L.K. Chan. 2012. Investigation on the effect of subculture frequency and inoculum size on the artemisinin content in a cell suspension culture of *Artemisia annua* L. *Australian Journal of Crop Science* 6: 801-807.
 23. Maës, O., P. Coutos-Thévenot, T. Jouenne, M. Boulay y J. Guern. 1997. Influence of extracellular proteins, proteases and protease inhibitors on grapevine somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50: 97-105.
 24. Mauri, P.V. y J.A. Manzanera. 2003. Induction, maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex* L.) somatic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 74(3): 229-235.
 25. Márquez-Martín, B., A. Barceló-Muñoz, F. Pliego-Alfaro y C. Sánchez-Romero. 2012. Somatic embryogenesis and plant regeneration in avocado (*Persea americana* Mill.): Influence of embryogenic culture type. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 21(2): 180-188.
 26. McCown, B. y G. Lloyd. 1981. Woody plant medium (WPM) a revised mineral formulation for micro-culture of woody plant species. *HortScience* 16: 453.
 27. Moscatiello, R., B. Baldan y L. Navazio. 2013. Plant cell suspension cultures. En: F.J.M. Maathuis (ed.). *Plant Mineral Nutrients: Methods and Protocols*. Humana Press. New York, USA. pp. 77-93.
 28. Murashige, T. y G. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologiae Plantarum* 15: 473-497.
 29. Mustafa, N.R., W. de Winter, F. van Iren y R. Verpoorte. 2011. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature Protocols* 6: 715-742.
 30. Orozco-Sánchez, F., R. Hoyos-Sánchez y M. Arias-Zabala. 2002. Establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *Eucalyptus cinerea*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 4(1): 43-48.
 31. Ozeki, Y. y A. Komamine. 1985. Effects of inoculum density, zeatin and sucrose on anthocyanin accumulation in a carrot suspension culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 5: 45-53.
 32. Perán-Quesada R., C. Sánchez-Romero, A. Barceló-Muñoz y F. Pliego-Alfaro. 2004. Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. *Scientia Horticulturae* 102: 61-73.
 33. Salaj, T., A. Blehová y J. Salaj. 2007. Embryogenic suspension cultures of *Pinus nigra* Arn.: growth parameters and maturation ability. *Acta Physiologiae Plantarum* 29(3): 225-231.
 34. Sánchez Romero, C. 2021. Use of meta-topolin in somatic embryogenesis. En: N. Ahmad, & M. Strnad (eds.). *Meta-topolin: A*

- Growth Regulator for Plant Biotechnology and Agriculture. Springer. Singapore. pp. 187-202.
35. Santacruz-Ruvalcaba, F. y L. Portillo. 2009. Thin cell suspension layer as a new methodology for somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *Industrial Crops and Products* 29: 609-614.
36. Singh, G. 2005. High density planting in guava - Application of canopy architecture. *ICAR News* 11: 9-10.
37. Soomro, R. y R.A. Memon. 2007. Establishment of callus and suspension culture in *Jatropha curcas*. *Pakistan Journal of Botany* 39: 2431-2441
38. Szabados, L., L.A. Mroginski y W M. Roca. 1991. Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. *In*: Roca W. & Mroginski L. (eds.). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones Prácticas*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Palmira, Colombia. pp. 173-210.
39. Vilchez, J., N. Albany, R. Gómez-Kosky y L. García. 2002. Inducción de embriogénesis somática en *Psidium guajava* L. a partir de embriones cigóticos. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia* 19(4): 284-293.
40. Vilchez, J y N. Albany. 2015. Determinación de parámetros de cultivo en la germinación de embriones somáticos de *Psidium guajava* L. en sistemas de inmersión temporal de tipo RITA®. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia* 32: 209-230.
41. von Arnold, S. 2008. Somatic embryogenesis. *In*: M. George, A. Hall y G. De Klerk (eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture: The Background*. Springer. Dordrecht, The Netherlands. pp. 335-354.
42. Wang, Y., Z. Jeknić, R. C. Ernst y T.H.H. Chen. 1999. Efficient plant regeneration from suspension-cultured cells of Tall Bearded Iris. *HortScience* 34: 730-735.
43. Witjaksono, L. y R. E. Litz. 1999. Induction and growth characteristics of embryogenic avocado cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58(1): 19-29.
44. Zimmerman, J.L. 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5(10): 1411-1423.