

Cultivo *in vitro* de embriones inmaduros del guayabo (*Psidium guajava* L.)¹

In vitro culture of guava (*Psidium guajava* L.) immature embryos

M. del C. Ramírez Villalobos² y E. G. Salazar Yamarte³

Resumen

Se cultivaron *in vitro* embriones inmaduros del guayabo (*Psidium guajava* L.) de frutos de plantas adultas cultivadas en el campo. Se evaluó el efecto de las citocininas: zeatina (ZEA) y ribozeatina (RZEA) a concentraciones de 0,1; 0,5 y 1 mg L⁻¹, 2-isopenteniladenina (2ip), benciladenina (BA) y cinetina (KIN) a 1, 5 y 10 mg L⁻¹. El diseño estadístico fue totalmente al azar con 5 repeticiones y 5 explantes como unidad experimental. Los tratamientos 1 mg L⁻¹ de 2ip, 0,1; 0,5 y 1 mg L⁻¹ de RZEA y ZEA y el testigo produjeron alta formación de callo desde los 5 días de la siembra, a los 50 días no hubo diferencias significativas entre estos tratamientos en el porcentaje de explantes con formación de callo. El mejor tratamiento para inducir embriones somáticos fue 0,1 mg L⁻¹ de ZEA (60%). El tratamiento 1 mg L⁻¹ de 2ip dio origen a la formación de estructuras de pequeños apéndices alargados hialinos (84%). La presencia de citocininas en el medio de cultivo no fue necesaria para la inducción de callo, aunque, si se requirió para la inducción de embriones somáticos e incrementar el porcentaje de explantes con embriones somáticos. Los embriones inmaduros del guayabo cultivados *in vitro* presentaron respuesta a la callogénesis y embriogénesis somática, esto podría representar una alternativa para la recuperación de germoplasma e inducción de variación somaclonal con fines de mejoramiento genético.

Palabras claves: Citocininas, callo, embriones somáticos, *Psidium guajava*.

Abstract

Immature embryos taken from guava (*Psidium guajava* L.) adult plants grown in the field were cultured *in vitro*. The effect of the cytokinins: zeatin (ZEA) and ribozeatin (RZEA) at the concentrations of 0.1; 0.5 and 1 mg L⁻¹, and 2-isopentenyladenine (2ip), benzyladenine (BA) and kinetin (KIN) at the concentra-

Recibido el 01-04-1997 ● Aceptado el 20-03-1998

1. Trabajo realizado durante la Práctica Profesional del Posgrado de Fruticultura.

2. Posgrado de Fruticultura. Facultad de Agronomía. La Universidad del Zulia (LUZ). Apartado 15205. Maracaibo, Zulia 4005.

3. Departamento de Biotecnología. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). Apartado 4653. Maracay 2101.

tions 1, 5 y 10 mg L⁻¹ were evaluated. The statistical design was totally randomized with 5 repetitions and 5 explants as experimental units. Treatments 1 mg L⁻¹ of 2ip, 0.1; 0.5 and 1 mg L⁻¹ of RZEA and ZEA and the control resulted in high callus formation since the fifth day of culture. Fifty days after culture initiation there was no significant differences in callus formation among the treatments. The best treatment to the induction of somatic embryos was that 0.1 mg L⁻¹ of ZEA (60%). The treatment 1 mg L⁻¹ of 2ip generated structures that consisted of small, elongated, hyaline appendixes (84%). The presence of cytokinins in the culture medium was not necessary for the callus induction, although it was required for the induction of somatic embryos and the increment of the percentage of explants with somatic embryos. The immature guava embryos presented response to callus and embryo formation when cultured *in vitro*, this could represent an alternative for the recovery of germplasm and the induction of somaclonal variation for breeding purposes. **Keys word:** Cytokinins, callus, somatics embryos, *in vitro*, *Psidium guajava*.

Introducción

Todos los tejidos vegetales cultivados *in vitro*, tienen la capacidad potencial para formar callos, aunque, relativamente son pocos los explantes que poseen la habilidad para producir callos embriogénicos (15). Usualmente, los explantes provenientes de cotiledones, hipocótilos y/o embriones cigóticos, ápices caulinares, segmentos de hojas, raíces e inflorescencias inmaduras (15) han sido utilizados con éxito para obtener callos embriogénicos en varias especies de la mayoría de las familias de plantas (1).

El cultivo *in vitro* de embriones ha sido efectivo en el rescate de embriones abortivos derivados a partir de hibridación interespecífica o intergenérica (17) y en el rescate de material de propagación de frutales con semillas de baja viabilidad (14). Así como también, para acortar la latencia de semillas que en algunos casos es debida a inhibidores del desarrollo del embrión, presentes en el endosperma o en la cubierta de la semilla. El cultivo de embriones ha ayudado al

mejoramiento genético de especies arbóreas porque permite acortar el período de siembra a floración (14).

En un sentido estricto, el material no se está multiplicando clonalmente, aunque, si se está multiplicando el germoplasma que de otra manera se perdería, por tanto, se justifique incluir este sistema en la lista de estrategias para la multiplicación (12) del guayabo. Es posible que las plantas producidas mediante técnicas de ovarios, óvulos, anteras y embriones sean disímiles a los progenitores y que, en consecuencia no corresponda estrictamente a la propagación clonal, sin embargo, existen algunos casos en los que se ha logrado realmente una propagación clonal del individuo (22).

Guerra *et al.* (9) indicaron que los sistemas de micropropagación son una herramienta importante para el mejoramiento y la propagación clonal masiva de genotipos seleccionados y que el uso de embriones puede justificarse cuando los métodos de

propagación convencionales presentan una baja eficiencia en la especie.

El guayabo es una especie leñosa en la cual se han reportado problemas para su establecimiento *in vitro* (21), los cuales han sido asociados a la procedencia de la planta madre, sobretodo, cuando esta es adulta y esta cultivada directamente en el campo. Al respecto, Caso (3) mencionó que cuando los individuos han alcanzado su estado adulto es casi imposible clonarlos y que en la mayoría de las

especies dicha condición de adultez restringe las capacidades morfogenéticas del individuo. Por lo que, será más fácil lograr organogénesis en cultivos *in vitro* cuando éste se inicia a partir de explantes separados de ejemplares juveniles o partes distintas del embrión.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de varias citocininas en el cultivo *in vitro* de embriones inmaduros del guayabo.

Materiales y métodos

En este estudio se utilizó el clon 5 de la Colección de Germoplasma de Guayabo (*Psidium guajava* L.) del Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP) de Maracay, Estado Aragua.

Los explantes se extrajeron de frutos inmaduros con un tamaño promedio de 2,5 cm x 2,9 cm (20 - 25 días de edad), presentando embriones sin el endosperma desarrollada, este procedimiento es similar a uno de los recopilados por Litz (14) para el cultivo de embriones de *Carica papaya*. Los frutos se desinfectaron con benomil (14 g L⁻¹) más rifampicina (300 mg L⁻¹) por 30 min, 1 min en alcohol etílico al 75 % y 10 min en hipoclorito de calcio al 10 %. Posteriormente, se efectuaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Bajo condiciones asépticas, en la campana de flujo laminar horizontal y con ayuda de un estereoscopio, se procedió a disectar los frutos en forma longitudinal para aislar los embriones, sin ocasionarles daños. Una vez realizado el corte, se aplicó al fruto una

solución antioxidante (8). Al aislar el embrión, se realizó inmediatamente la siembra en tubos de 150 mm x 25 mm con 10 mL de medio nutritivo Murashige y Skoog (MS) (18), complementado con 1 mg L⁻¹ de las siguientes vitaminas: tiamina, piridoxina y ácido nicotínico, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 30 g L⁻¹ de sacarosa y 7 g L⁻¹ de agar.

Los tratamientos se obtuvieron de la combinación de cinco fuentes de citocininas y tres niveles de concentración cada una. Las citocininas fueron: Ribozeatina (RZEA), zeatina (ZEA), cinetina (KIN), benciladenina (BA) y 2-isopenteniladina (2ip). Los niveles de concentración para 2ip, KIN y BA fueron 1, 5 y 10 mg L⁻¹, y para el resto de las citocininas 0,1; 0,5 y 1 mg L⁻¹. El testigo estuvo representado por cero citocinina. Todos los tratamientos se ajustaron a un pH de 5,8 ± 0,02 antes de la esterilización en el autoclave a 121°C y 1,1 kg cm⁻² por 20 min (7). Los embriones se incubaron a 26 ± 2°C, fotoperíodo de

16 h bajo luz fluorescente con irradiancia de $16,95 \text{ W m}^{-2}$. A los 20 días después de la siembra se realizó un cambio a medio fresco.

El diseño estadístico fue totalmente al azar con 5 repeticiones y 5 explantes como unidad experimental. Las variables de estudio fueron porcentajes de explantes contaminados, por hongos y/o bacterias (PEC), oscurecidos (POS), con formación de callo (PEFC) y con

embriones somáticos (PEES), porcentaje de supervivencia (PSU) y de medios con oscurecimiento u oscurecidos (PMO). Las variables fueron analizadas con el paquete SAS (19), cuando hubo efectos significativos se aplicó la prueba Tukey.

EL PEC se evaluó hasta los 50 días, POS el primer día, PMO a los 5 y 50 días, PSU y PEFC a los 5, 25 y 50 días, y PEES a los 25 y 50 días.

Resultados y discusión

A los 50 días del establecimiento *in vitro* de los embriones inmaduros, el porcentaje de explantes contaminados fue de 0% en todos los tratamientos con el método de desinfección superficial utilizado (cuadro 1). La procedencia de los explantes de la parte interna del fruto contribuyó al éxito del establecimiento de los explantes, sin problemas de microorganismos contaminantes, hongos y/o bacterias, lo cual se asoció a que los explantes se encontraban en un ambiente estéril (14) dentro del fruto, excepto en aquellas condiciones donde los frutos presentaron daños mecánicos, por insectos o agentes contaminantes. Por lo tanto, es importante considerar la selección de frutos sanos, sin ningún tipo de daño para garantizar la condición aséptica de los embriones.

En el cuadro 1 se muestra que el porcentaje de explantes oscurecidos para el primer día de la siembra fue de 100 % en todos los tratamientos. Los explantes se caracterizaron por presentar la cubierta del embrión

totalmente oscurecida, aunque, está tendió a abrirse después del quinto día cuando se inició la formación de callo, en la mayoría de los explantes, en la zona del embrión que estaba descubierta.

En el medio de cultivo, la zona alrededor del explante tomó una coloración oscura asociada a los exudados de compuestos fenólicos emitidos por el embrión, que son oxidados por enzimas del tipo polifenoloxidasas (4). La variable porcentaje de medios oscurecidos presentó 4 grupos de significancia a los 5 días de la siembra, siendo el grupo de menores porcentajes el correspondiente al testigo, $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de RZEA, 1 mg L^{-1} de KIN, 1 y 5 mg L^{-1} de Zip. Los grupos de significancia permitieron inferir que el porcentaje de medios oscurecidos este relacionado con el nivel y tipo de citocinina aplicada.

Después del cambio a medio fresco, a los 20 días, no hubo exudados emitidos por el embrión en el medio de cultivo, lo cual se muestra con los valores de 0% de medios oscurecidos registrados en todos los tratamientos a los 50 días de la siembra.

Cuadro 1. Efecto de las citocininas en el porcentaje de explantes oscurecidos, porcentaje de medios oscurecidos y porcentaje de supervivencia de embriones inmaduros del guayabo cultivados *in vitro*.

Trat. (mg L ⁻¹)	PEC		PMO		PSV		
	50 d	1 d	5 d	50 d	5 d	25 d	50 d
Testigo	0	100	48 ^d	0	100	88	88 ^a
0,1 RZEA	0	100	48 ^d	0	100	100	88 ^a
0,5 RZEA	0	100	62 ^c	0	100	84	84 ^{ab}
1 RZEA	0	100	60 ^c	0	100	92	72 ^c
0,1 ZEA	0	100	72 ^{ab}	0	100	76	76 ^c
0,5 ZEA	0	100	60 ^c	0	100	88	88 ^a
1 ZEA	0	100	72 ^{ab}	0	100	92	72 ^c
1 KIN	0	100	52 ^d	0	100	32	12 ^e
5 KIN	0	100	92 ^a	0	100	52	28 ^d
10 KIN	0	100	92 ^a	0	100	76	0 ^f
1 BA	0	100	64 ^{bc}	0	80	92	0 ^f
5 BA	0	100	60 ^c	0	76	52	0 ^f
10 BA	0	100	88 ^a	0	72	32	0 ^f
1 2ip	0	100	48 ^d	0	100	100	92 ^a
5 2ip	0	100	52 ^d	0	100	4	0 ^f
10 2ip	0	100	64 ^{bc}	0	100	0	0 ^f

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Nota: A los 20 días se efectuó un cambio a medio fresco. PEC: Porcentaje de explantes contaminados. POS: Porcentaje de explantes oscurecidos. PMO: Porcentaje de medios oscurecidos. PSV: Porcentaje de supervivencia. RZEA: ribozeatina. ZEA: zeatina. KIN: cinetina. BA: benciladenina. 2ip: 2-isopenteniladenina.

El porcentaje de supervivencia a los 5 días fue de 100%, excepto en los tratamientos de 1, 5 y 10 mg L⁻¹ de BA que presentaron los menores valores, posiblemente la benciladenina tenga algún efecto en esta variable, por ser un compuesto muy activo (11). A los 25 días se observó una disminución en el porcentaje de supervivencia en todos los tratamientos, excluyendo a 0,5 mg L⁻¹ de RZEA y 1 mg L⁻¹ de 2ip con 100% cada uno. En el testigo, 0,5 mg L⁻¹ de RZEA, 0,1 y 0,5 mg L⁻¹ de ZEA esta

variable permaneció constante desde los 25 días.

A los 50 días, los valores más altos del porcentaje de supervivencia se registraron en 1 mg L⁻¹ de 2ip, testigo, 0,1; 0,5 y 1 mg L⁻¹ de RZEA no observándose diferencias entre estos tratamientos, aunque, estos si fueron diferentes al resto, por lo que posiblemente el tipo y nivel de citocinina también influyó en el porcentaje de supervivencia.

En 10 mg L⁻¹ de KIN, BA, 5 y 10

mg L⁻¹ de 2ip el porcentaje de supervivencia fue de 0%, en el resto de los tratamientos ocurrió un descenso en esta variable. En 2ip se nota que con la dosis de 1 mg L⁻¹ se logró 92% de supervivencia, aunque, con dosis iguales o mayores de 5 mg L⁻¹ esta citocinina afectó el porcentaje de supervivencia a 0%, desde los 25 días de la siembra.

En el cuadro 2 se aprecia que a los 5 días hubo formación de callo, verde claro, en todos los tratamientos y en el rango de 25 a 50 días no hubo aumento

en el porcentaje de explantes con formación de callo, el cual se mantuvo constante. En pera japonesa (*Pyrus serotina*) la formación de callo en embriones inmaduros se observó entre las 2^{da} - 4^{ta} y 7^{ma} - 10^{ma} semanas, lo cual contrasta con los resultados obtenidos en guayabo donde al quinto día hubo una alta formación de callo en medio MS, con o sin aplicación de citocinina (10).

Los tratamientos testigo, 0,1; 0,5 y 1 mg L⁻¹ de RZEA y ZEA, y 1 mg L⁻¹ de 2ip presentaron los mayores

Cuadro 2. Efecto de las citocininas en los porcentajes de explantes con formación de callo y con embriones somáticos durante el cultivo *in vitro* de embriones inmaduros del guayabo.

Trat. mg L ⁻¹	PEFC			PEES	
	5 d	25 d	50 d	25 d	50 d
Testigo	88	88	88 ^{ab}	36	36 ^b
0,1 RZEA	84	100*	100 ^{*a}	20	20 ^e
0,5 RZEA	88	96*	96 ^{*a}	32	36 ^b
1 R ZEA	88	92*	92 ^{*a}	8	28 ^{cd}
0,1 ZEA	92	100*	100 ^{*a}	60	60 ^a
0,5 ZEA	88	88*	88 ^{*ab}	28	32 ^{bc}
1 ZEA	72	92*	92 ^{*a}	24	32 ^{bc}
1 KIN	40	40	40 ^d	4	4 ^f
5 KIN	44	52	52 ^c	4	4 ^f
10 KIN	28	28	28 ^e	0	0 ^f
1 BA	8	8	8 ^f	0	0 ^f
5 BA	8	8	8 ^f	0	0 ^f
10 BA	4	8	8 ^f	0	0 ^f
1 2ip	92	100	100 ^a	20 ^a	84 ^a
5 2ip	16	24	24 ^e	0	0 ^f
10 2ip	20	20	20 ^e	0	0 ^f

PEFC: Porcentaje de explantes con formación de callo. PEES: Porcentaje de explantes con embriones somáticos. *: La formación de callo tendió a tomar una apariencia reseca. □: Porcentajes referidos a la formación de apéndices hialinos alargados. Medias con letras distintas indican diferencias significativas (P < 0,05). RZEA: ribozeatina. ZEA: zeatina. KIN: cinetina. BA: benciladenina. 2ip: 2-isopenteniladenina.

porcentajes de explantes con formación de callo no existiendo diferencias significativas entre ellos, indicando esto que no sea necesaria la aplicación de citocinina en el medio de cultivo para inducir la formación de callo, resultado que coincide con investigaciones de Hiratsuka y Katagiri (10), quienes observaron en pera japonesa una alta formación de callo en embriones inmaduros con o sin aplicación de citocinina en el medio, sin embargo, en otras especies ocurre lo contrario (2, 7, 13).

En *Euphoria longan* se ha observado que la formación de callo fue dependiente de la presencia de citocinina (13) al igual que en explantes de raíces de *Lavandula stoechas* donde las citocininas, principalmente la BA, promovieron un mejor desarrollo de los callos (2), lo antes señalado en *L. stoechas* no concuerda con los resultados obtenidos con la BA, donde se obtuvieron los menores valores. En anteras de *Phaseolus vulgaris*, el uso de reguladores de crecimiento también fue fundamental para la formación de callo no encontrándose diferencias entre las citocininas bencilaminopurina (BAP) y KIN (7). Trabajos efectuados con las citocininas: BAP, KIN y N-6 isopentenilaminopurina a concentraciones variables registraron que las mejores tasas de proliferación de callo se obtuvieron con BAP y concluyeron que independientemente de la dosis de citocinina, siempre se presentaron formaciones de callo (6). Esto último también fue observado por Cramer y Bridgen (5) en segmentos de hojas de *Musaenda* donde la concentración de la citocinina BA no influyó en la

producción de callo. En las citocininas RZEA, ZEA y BA se encontró que no hubo diferencias entre las concentraciones empleadas en el porcentaje de explantes con formación de callo, resultados que son acordes con las investigaciones de Cramer y Bridgen (5) y Dublin (6), sin embargo, fueron diferentes al trabajo de Loiseau *et al.* (16), quienes encontraron que durante el cultivo de ápices de *Pisum sativum* la formación de callo incrementó con la concentración de las citocininas, principalmente BA y ZEA.

Las citocininas 2ip, a concentraciones de 5 y 10 mg L⁻¹, KIN y BA presentaron bajos porcentajes de explantes con formación de callo desde los 5 días de la siembra, sobretodo en la BA, posiblemente presenten algún efecto inhibitorio (11) a estas concentraciones, además, en el caso de la BA se presume que sea una respuesta de los explantes al alto efecto activo de esta hormona (11). Al respecto, Litz (13) señaló que durante la inducción de callos embriogénicos en explantes de hojas maduras de plantas adultas de *E. longan* la KIN fue raucho más efectiva que la BA.

Es necesario mencionar que la formación de callo en todos los tratamientos fue de aspecto no friable y compacto, lo cual podría indicar un bajo ritmo de división celular (20). Los explantes tratados con RZEA y ZEA manifestaron a partir de los 25 días un aspecto de resequeidad externa de color amarillento.

En relación al aspecto de la formación de callo en otras especies como *E. longan* se ha encontrado que la regeneración de callo fue blanca, de

crecimiento rápido y friable (13). En *Lavandula latifolia* (2) y *Pisum sativum* (16) ésta fue de consistencia compacta y verde en medios con citocininas, características que son acordes a las observadas en los explantes de guayabo.

En cuanto a la formación de embriones somáticos $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ZEA resultó ser el mejor por presentar el mayor porcentaje (60%) a los 25 y 50 días de cultivo, valor que fue significativamente diferente al resto de los tratamientos. La citocininas KIN, BA y 2ip no resultaron ser prometedoras para la inducción de embriones somáticos debido a que registraron valores entre 0 y 4%.

La formación de embriones somáticos se inició a partir de los 25 días con la presencia de pequeñas gotas cristalinas en la masa de callo que luego de 6 a 10 días cambiaban de cristalino a blancocrema. En *Feijoa sellowiana*, Guerra *et al.* (9) obtuvieron embriones somáticos de 15% a las 7 semanas a 35% a las 20 semanas y en embriones cigóticos intactos, maduros e inmaduros, encontraron 50 y 91% de embriones somáticos, respectivamente. Los resultados de estos investigadores contrastan con los obtenidos en guayabo donde ya a los 25 días se logró un 60% explantes con embriones somáticos, estas diferencias de comportamiento en la respuesta embriogénica son atribuidas a la diferencia de especies o factores genéticos (2, 15) y al estado de desarrollo de la planta (15).

En el tratamiento 1 mg L^{-1} de 2ip no se observó formación de embriones

somáticos, sin embargo, éste presentó un alto porcentaje de formación de estructuras (84%), muy diferentes a las del resto de los tratamientos, que consistieron de pequeños apéndices alargados cristalinos o hialinos que salían de la masa de callo.

Se encontró que no fue necesaria la presencia de citocininas en el medio para la inducción de callo, aunque, si fue requerida para la inducción de embriones somáticos e incrementar el porcentaje de explantes con embriones somáticos de 36% en el testigo a 60% con el uso de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ZEA en el medio. En investigaciones de Cramer y Bridgen (5) se señaló una situación similar con la BA, en vista que, la concentración de la citocinina no influyó en la producción de callo, aunque, si en la embriogénesis somática.

En este estudio, el desarrollo de embriones somáticos fue observado en el rango de 25 a 50 días, no manifestándose cambios de la etapa globular a las siguientes fases de corazón y torpedo. Esto posiblemente sea debido a que los embriones inmaduros contienen menos nutrimentos y el medio nutritivo MS con las citocininas no aportó los requerimientos necesarios para el desarrollo de los embriones. En este sentido, Hiratsuka y Katagiri (10) señalaron que tanto con embriones maduros como inmaduros se observó un desarrollo anormal, lo cual puede estar relacionado con la baja nutrición de los embriones inmaduros y con el estado de dormancia de los embriones maduros.

Algunos trabajos (6, 13, 16) indi-

can que pareciera necesaria la presencia o ausencia de ciertos compuestos o la modificación del medio de cultivo para la maduración y germinación de los embriones somáticos, ya que Litz (13) registró que tanto la maduración como la germinación ocurrieron en *E. longan* en medio B5 conteniendo bajas concentraciones de sucrosa y con 10% de agua de coco. Por otra parte, Loiseau *et al.* (16) encontraron que la adición de BA, ZEA y KIN en el medio con auxinas redujo la producción de embriones y que los aminoácidos glutamina, alanina y prolina no mejoraron la embriogénesis somática, además, concluyeron que la eficiencia embriogénica y el desarrollo de los embriones fueron promovidos por altas

concentraciones de carbohidratos.

La no ocurrencia de cambios en los embriones somáticos también puede ser explicada por que en medios muy ricos en citocininas, el desarrollo de las yemas neoformadas puede verse bloqueado y no formarse tallos y que las tasas de neoformación pueden depender del explante (edad del explante y estado fisiológico de la planta madre) y de las condiciones físicas y químicas del cultivo, sin embargo, existen casos donde ciertos compuestos como la sacarosa y las citocininas tienen un efecto positivo en la neoformación de yemas. También se ha sugerido que las citocininas pueden ser esenciales para la maduración y germinación de los embriones somáticos (6).

Conclusiones

Los tratamientos testigo, ribozeatina y zeatina indujeron alta formación de callo a partir del quinto día. La ribozeatina y zeatina mostraron efectos de apariencia reseca en la superficie del explante al día 25.

El mayor porcentaje de explantes con embriones somáticos se logró con 0,1 mg L⁻¹ de zeatina.

Los embriones inmaduros tratados con 1 mg L⁻¹ de 2-isopentiladenina presentaron una alta formación de callo desde los 5 días, y respuesta de formación de apéndices alargados hialinos a partir de los 25 días de cultivo *in vitro*.

La presencia de citocininas en el medio de cultivo no fue necesaria para la inducción de callo, aunque, si se requirió para la inducción de embriones somáticos e incrementar el porcentaje de explantes con embriones somáticos.

La respuesta de los embriones inmaduros a la callogénesis y embriogénesis somática indican una posibilidad a seguir para la propagación de germoplasma e inducción de mejoramiento genético al mejorar la maduración y germinación de los embriones somáticos.

Agradecimientos

Al Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) de Maracay, Estado Aragua, y a su Departamento de Biotecnología por su aceptación y colaboración en la realización de la Práctica Profesional del Posgrado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y

Tecnológicas (CONICIT) por la Beca otorgada para cursar estudios de Maestría en Fruticultura en la Facultad de Agronomía de La Universidad del Zulia.

Al Ing. Agr. Aly Urdaneta por su colaboración para el desarrollo de este trabajo.

Literatura citada

1. Ammirato, P. V. and F. Radler. 1983. Embryogenesis. *In*: p. 82-123. D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato and Y. Yamada (Eds). *Handbook of plant cell culture*. MacMillan Publishing, Nueva York. v. 1.
2. Calvo, M. C. and J. Segura. 1988. *In vitro* morphogenesis from explants of *Lavandula latifolia* and *Lavandula stoechas* seedlings. *Scientia Hort.* 36: 131-137.
3. Caso, H. O. 1992. Juvenilidad, rejuvenecimiento y propagación vegetativa de las especies leñosas. *Agriscientia* 9: 5-16.
4. Comptop, M. E. and J. E. Prece. 1986. Exudation and plant establishment. *Newstetter International Association for plant tissue* 50: 9-18.
5. Cramer, C. S. and M. P. Bridgen. 1997. Somatic embryogenesis and shoot proliferation of *Musaenda* cultivars. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 50: 135-138.
6. Dublin, P. 1991. Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao. p. 577-619. En: W. M. Roca y L. A. Mroginski (Eds). *Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Publicación N° 151.
7. Duarte de O., P., M. Pasqual e P. A. Lopes. 1994. Efeito de citocininas e auxinas sobre a formação de calos em cultura *in vitro* de anteras de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Eripa-za. *Revista Ceres* 41: 651-657.
8. Fitchet P. M. 1990. Dimple guava established in tissue culture. *Inglightingsbulletin Navorsingsinstituut vir Sitrus en Subtropiese Vrugte* 212: 5.
9. Guerra, M. P., R. Pescador, L. L. Dal Vesco, R. O. Nodari and J. P. Ducroquet. 1996. *In vitro* morphogenesis in *Feijoa sellowiana*: somatic embryogenesis. *Proc. Int. Sym. Myrtaceae*. L. C. Donadio (Ed). *Acta Hort.* 452: 27-35. ISSHT 1997.
10. Hiratsuka, S. and M. Katagiri. 1988. Shoot and callus formation in explants from immature seeds of Japonese pear. *Scientia Hort.* 34: 193-199.
11. Krikorian, A. D. 1991. Medios de cultivo: Generalidades, composición y preparación. p. 41-77. En: W. M. Roca y L. A. Mroginski (Eds). *Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Publicación N° 151.
12. Krikorian, A. D. 1991. Propagación clonal *in vitro*. p. 95-125. En: W. M. Roca y L. A. Mroginski (Eds). *Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Publicación N° 151.

13. Litz, R. E. 1987. Somatic embryogenesis from leaf callus of *Euphoria longan* Lam. Proc. Interam. Soc. Trop. Hort. 31: 72.
14. Litz, R. E. 1991. Cultivo de embriones y óvulos. p. 300-338. En: W. M. Roca y L. A. Mroginski (Eds). Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Publicación N° 151.
15. Litz, R. E. y R. L. Jarret. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: Embriogénesis somática y organogénesis. p. 143-172. En: W. M. Roca y L. A. Mroginski (Eds). Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Publicación N° 151.
16. Loiseau, J., C. Marche and Y. Le Deunff. 1995. Effects of auxins, cytokinins, carbohydrates and amino acids on somatic embryogenesis induction from shoot apices of pea. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 41: 267-275.
17. Mendoza De G., E. 1994. Agrobiotecnología. Grupo Editorial Iberoamericana S.A. de C.V. México, DF.
18. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue. Phys. Plant. 15: 473-493.
19. SAS Institute Inc., 1979. SAS USER'S Guide. The Institute INC, Cary, NC., USA. pp. 264.
20. Sondhal, M., T. Nakamura and W. Sharp. 1991. Propagación *in vitro* del café. p. 621-642. En: W. M. Roca y L. A. Mroginski (Eds). Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Publicación N° 151.
21. Vilorio V., Z. J. 1993. Cultivo *in vitro* de nudos de guayabo (*Psidium guajava* L.). Fase I. Trabajo de Ascenso. La Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. Maracaibo, Venezuela. 35 p.
22. Yang, H. Y. and C. Zhou. 1982. *In vitro* induction of haploid plants from a pollinated ovaries y ovulos. Theor. Appl. Genet. 63: 97-104.