

Caracterización morfo-histológica de la embriogénesis somática en guayaba (*Psidium guajava* L.) cv. Enana Roja Cubana EEA-1840

Morpho-histological characterization of the somatic embryogenesis in guava (*Psidium guajava* L.) cv. Red Dwarf Cuban EEA-1840

Jorge A. Vilchez Perozo^{1*}, Nilca R. Albany de Vilchez²,
Fernando Pliego Alfaro³, Carolina Sánchez Romero³,
Leonardo J. Martínez Ferrer¹ y Leyanis García Aguila⁴

¹Departamento de Botánica. ²Departamento de Química, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, AP 15205, Maracaibo, Edo. Zulia (4005ZU), República Bolivariana de Venezuela. Correo electrónico: jvilchezp@fa.luz.edu.ve. ³Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos, s/n 29071 Málaga, España. ⁴Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Santa Clara, Villa Clara, CP 54830, Cuba.

Resumen

Debido a la escasa información sobre la caracterización morfo-histológica de la embriogénesis somática (EmbS) de guayabo, se planteó estudiar estos aspectos sobre callo embriogénico (CE) en la inducción, CE y embriones somáticos (ES) en la multiplicación y ES en la maduración y germinación. La EmbS se realizó siguiendo los protocolos de Vilchez *et al.* (2002), Vilchez *et al.* (2004) y Vilchez y Albany (2015). El estudio histológico reveló que la ES fue indirecta y de baja frecuencia, observándose una fase intermedia de callo previo a la formación de estructuras embriogénicas diferenciadas a partir de los tejidos epidérmicos y subepidérmicos del embrión cigótico inmaduro. En la multiplicación, se evidenciaron dos tipos de tejidos proliferantes, uno formado por un tejido meristemático y otro ubicado en la base de los ES diferenciados en torpedo-elongado y cotiledonar. En la maduración, los ES mostraron un tejido vascular incipiente, bien diferenciado y en la germinación se caracterizaron por tener “forma de pera” similares a otras angiospermas dicotiledóneas leñosas.

Palabras clave: embrión somático, *Psidium guajava* L., diferenciación de tejidos.

Recibido el 06-02-2017 • Aceptado el 02-08-2019

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: jvilchezp@fa.luz.edu.ve

Abstract

Due to the scarce information on the morphological and histological characterization of the somatic embryogenesis (EmbS) of guava, it was proposed to study these aspects on embryogenic callus (EC) in the induction, EC and somatic embryos (ES) in the multiplication and ES in the maturation and germination. The EmbS was performed following the protocols of Vilchez *et al.* (2002), Vilchez *et al.* (2004) and Vilchez and Albany (2015). The histological study revealed that ES was indirect and low frequency, showing an intermediate callus phase prior to the formation of differentiated embryogenic structures from the epidermal and sub-epidermal tissues of the immature zygotic embryo. In the multiplication, two types of proliferating tissues were evidenced, one formed by a meristematic tissue and another located at the base of the ES differentiated in torpedo-elongated and cotyledon. During the maturation, ES showed a well-differentiated incipient vascular tissue and in the germination they were characterized by having “pear-shaped” similar to other dicotyledonous woody angiosperms.

Keywords: somatic embryo, *Psidium guajava* L. and tissue differentiation.

Introducción

La embriogénesis somática es una vía de regeneración de plantas de gran interés, ya que permite la obtención de embriones somáticos a gran escala con una elevada tasa de multiplicación y rejuvenecimiento del material vegetal, además de constituir la base de la producción de la semilla artificial (von Arnold *et al.*, 2002). Este tipo de morfogénesis ha sido demostrada en pocas especies de la familia Myrtaceae y en la mayoría de los casos han abordado estudios fisiológicos, bioquímicos y morfológicos, pero se desconocen muchos elementos del desarrollo de este proceso, a la vez que se dispone de pocos datos desde el punto de vista histológico, que permitan una mayor comprensión del mismo y de los mecanismos que conducen a una

célula más o menos diferenciadas readquirir sus potencialidades embriogénicas (Akhtar, 2013; Delporte *et al.*, 2014). En este sentido, el estudio morfológico e histológico de la embriogénesis somática en guayabo ocupa un papel preponderante, porque permite conocer la composición celular de los tejidos y la organización de sus estructuras; por ello se planteó estudiar la histología y morfología de la embriogénesis somática de guayabo (*Psidium guajava* L.) cv. Enana Roja Cubana EEA-1840.

Materiales y métodos

Esta investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología “Profa. Silvia León de Sierralta”, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Para el desarrollo de la embriogénesis somática en guayabo cv. Enana Roja Cubana EEA-1840 se realizó partiendo de embriones cigóticos inmaduros, siguiendo los protocolos descritos por Vilchez *et al.* (2002), Vilchez *et al.* (2004) y Vilchez y Albany (2015) para las fases de inducción, multiplicación, maduración y germinación de los embriones somáticos, respectivamente.

Para estudiar la histología y morfología de la embriogénesis somática en guayabo se tomaron ocho muestras de cada tejido, siendo estos: callo embriogénico de la fase de inducción, callo embriogénico y embriones somáticos de la fase la multiplicación y embriones somáticos de las fases de maduración y germinación. Las muestras se fijaron durante 24-48 h en una solución de formaldehído-ácido acético glacial-alcohol etílico (FAA) al 5:5:90% (v/v), respectivamente. Luego se realizó un lavado con agua corriente durante 24 h para eliminar el exceso de fijador. Una vez concluido el lavado, se deshidrataron en concentraciones ascendentes de alcohol etílico de 50, 75, 85, 95 y 100% (v/v), durante períodos de 2 h. Después del proceso de deshidratación las muestras fueron aclaradas con xilol y se embebieron en una serie de tres cambios en parafina (57-58 °C) con un tiempo de impregnación de 1,5 h. Seguidamente fueron incluidas en bloques de parafina a los que se les realizaron cortes seriados con un espesor de 5-8 μm , utilizando un micrótopo manual de deslizamiento vertical Leica RM2125 RTS. A las

secciones histológicas se les realizó una tinción simple con safranina y fueron montados en portaobjetos para su posterior observación en un microscopio plano Leica® con cámara digital. La fotodocumentación se realizó con objetivos de 4X, 10X, 40X y 100X.

Resultados y discusión

Morfológicamente se observó que después de siete días en la fase de inducción, los embriones cigóticos inmaduros cambiaron su color de blanco-opaco a crema amarillento e incrementaron su tamaño aproximadamente en un 40%. Alrededor de los 25 días en la fase de inducción, se observó la formación de un callo de color marrón oscuro en la superficie en contacto con el medio de cultivo y un segundo callo de color marrón claro brillante, friable y con algunos embriones somáticos aislados en diferentes etapas de desarrollo, que hacia los 45-50 días, mostraron algunas zonas con callo nodular, friable al tacto y de color pardo-castaño claro, denominado y cuantificado en este estudio como callo embriogénico. Las diferentes coloraciones y tonalidades observadas en el callo inicial, son semejantes a las reportadas por Akhtar (2013) en la fase de inducción de embriogénesis somática de guayabo cv. Allahabad Safeda y según este autor pudieran reflejar la formación de un gradiente de concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) entre las diferentes capas de células; lo cual pudiera ser debido al gradiente de difusión entre la auxina y el tejido,

pero esto requiere de una investigación bioquímica para su confirmación.

Sobre la superficie del callo embriogénico fue posible observar estructuras globulares traslúcidas semejantes a embriones que, de manera aislada y eventual, mostraron un desarrollo morfológico diferente, identificándose como embriones somáticos diferenciándose luego en embriones somáticos torpedo y cotiledonar (figura 1a). En algunos casos, en el callo embriogénico se desarrollaron estructuras nodulares muy compactas, friables, de color pardo claro (figura 1b). Dichas estructuras, también denominadas “masas celulares pro-embriogénicas” (Merkle, 1995), se reconoce como una fase o etapa esencial para alcanzar procesos morfogenéticos con altas frecuencias de regeneración en especies leñosas (von Arnold *et al.*, 2002).

El estudio histológico durante la inducción de la embriogénesis somática en guayabo, mostró que hacia los 10 días de cultivo fueron evidentes las etapas iniciales de la formación de un callo, probablemente originado a partir de los tejidos epidérmicos y sub-epidérmicos del embrión cigótico inmaduro (Figura 1c). Hacia los 25 días fue posible diferenciar histológicamente la existencia de callo friable y sobre la periferia de este se observó tejido embriogénico caracterizado por presentar divisiones celulares anticlinales y periclinales de células meristemáticas isodiamétricas de pequeño tamaño (<30 μm) con núcleo prominente y fuertemente teñidas (figura 1d), lo que indica un alto contenido de material proteico que, de

acuerdo con Michaux-Ferrière *et al.* (1992), se trata de nucleoproteínas producto de la elevada tasa de división celular existente. Las características observadas en el callo embriogénico coinciden con las descritas para otras Myrtaceae como *Myrtus communis* L. (Canhoto *et al.*, 1999) y otras especies como *Elaeis guineensis* Jacq. (Balzon *et al.*, 2013).

En la fase de multiplicación histológicamente se observaron dos tipos de tejidos proliferantes. El primero formado por un tejido meristemático, parecido morfológicamente al suspensor, a partir del cual se originaron los embriones somáticos. Este tejido se ubicó sobre las capas superiores de los callos embriogénicos (figura 1e). El segundo tejido proliferante se ubicó sobre un callo friable que se formó en la base de los embriones somáticos diferenciados en etapas torpedo-elongado y cotiledonar (figura 1e). Sobre la base de algunos embriones aislados en etapa torpedo-elongado y cotiledonar se observó la diferenciación de nuevos embriones de forma directa (figura 1e). En ninguno de los tipos de tejidos proliferantes fue posible observar claramente el suspensor.

Histológicamente, en las etapas torpedo-elongado y cotiledonar comenzaron a hacerse visibles por primera vez tejidos más diferenciados como la protodermis (figura 1f) y un incipiente tejido vascular (figura 1g). 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

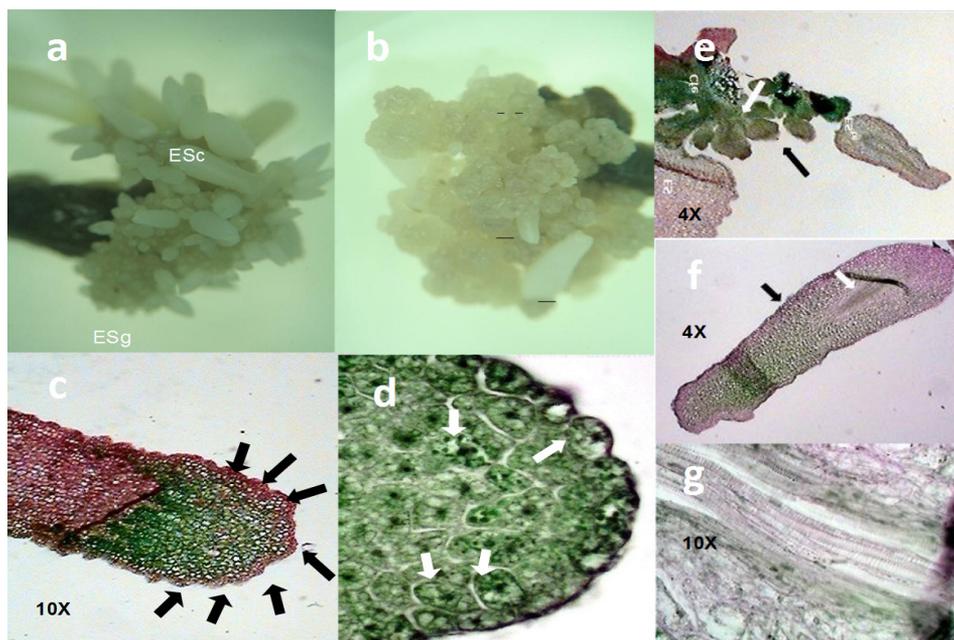


Figura 1. Morfología en histología de la embriogénesis somática en *Psidium guajava* L. a) Callo embriogénico con embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo ESg: embrión somático globular, ESSt: embrión somático torpedo y ESsc: embrión somático cotiledonar. b) Estructuras nodulares muy compactas friables, de color pardo claro correspondientes morfológicamente a masas celulares pro-embriogénicas (ME). c) Embrión cigótico inmaduro (ECi) a los 10 días de cultivo en medio de inducción de embriogénesis, las flechas negras indican formación de callo por debajo de la epidermis en el extremo basal (10X). d) Callo embriogénico (CE) con células meristemáticas (flechas blancas) a los 45-50 días en medio de inducción de embriogénesis (40X). e) Embrión somático (ES) con callo friable embriogénico en su base (Cfe), con presencia de tejido matricial (flecha blanca) con embriones somáticos en fase globular sobre la periferia (flecha negra). Se observa un embrión somático en fase torpedo-elongado (4X). f) Embrión somático en etapa torpedo-elongado con presencia de protodermis (flecha negra) y esbozos de cambium vascular (flecha blanca) (4X). g) Tejido vascular incipiente (10X).

anteriores (Canhoto *et al.*, 1999). Este hecho en el guayabo pudiera deberse a las condiciones de cultivo o simplemente a las condiciones genéticas propias de la especie. El tipo de embrión somático observado fue morfológicamente similar a los embriones somáticos que aparecen en *Hevea brasiliensis* denominados “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.

Conclusiones

La embriogénesis somática en el guayabo fue indirecta y de baja frecuencia, observándose formación de estructuras embriogénicas diferenciadas a partir de los tejidos epidérmicos y sub-epidérmicos del embrión cigótico inmaduro. En la fase de multiplicación, se observaron dos tipos de tejidos proliferantes, uno formado por un tejido meristemático ubicado en capas superiores de callo embriogénico y el segundo tejido proliferante se ubicó en la base de los embriones somáticos diferenciados en etapa torpedo-elongado y cotiledonar. En las etapas torpedo-elongado y cotiledonar de la maduración-germinación se visualizó la protodermis y un incipiente tejido vascular.

Literatura citada

Akhtar, N. 2013. Temporal regulation of somatic embryogenesis in guava

(*Psidium guajava* L.). JHSB. 88 (1): 93-102.

Balzon, T. A., Zanderluc, G. L., y J. E. Scherwinski-Pereira. 2013. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. *In vitro* Cell Dev Biol Plant. 49(1): 41-50.

Canhoto J. M., M. L. Lopes y G. S. Cruz 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (*Myrtus communis* L.). PCTOC. 57:13-21

Delporte, F., A. Pretova, P. Du Jardin y B. Watillon. 2014. Morpho-histology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures of wheat. *Protoplasma*, 251(6): 1455-1470.

Merkle, S. A. 1995. Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. *Plant Tissue Cult Biotechnol*1.(3): 112-120

Michaux-Ferrière, N., H. Grout y M. P. Carron. 1992. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). *Am. J. Bot.* 79(2): 174-180.

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®. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 32: 209-230.

Vilchez, J., N. Albany, R. Gómez-Kosky y L. García. 2002. Inducción de embriogénesis somática en *Psidium guajava* L. a partir de embriones cigóticos. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 19(4): 284-293.

Vilchez, J., N. Albany, R. Gómez-Kosky, L. García. 2004. Secondary embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. *Trop. Agric. (Trinidad)*. 81(1): 41-44.

von Arnold S., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok y L. Filonova. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. PCTOC69: 233-249.