

HISTOLOGÍA DE LA REGENERACIÓN DE BROTES ADVENTICIOS EN HOJAS DE PLÁNTULAS DE GUAYABO (*Psidium guajava* L.) CV. ENANA ROJA CUBANA CULTIVADAS *In Vitro*

Lelurllys Nápoles✉, O. Concepción, P. Marrero, Ninel Peralta, Aurora T. Pérez y R. Trujillo

ABSTRACT. A histological study was performed for adventitious shoot regeneration of leaves from *in vitro* cultured plantlets of guava (*Psidium guajava* L.), in order to determine the morphogenetic mechanism that allows shoot regeneration and to show the role of wound in this process. After an adequate *in vitro* culture period, leaves were removed from apical shoots and wounded at the main vein. Then, leaves were inoculated in 25 mL of regeneration medium MS supplemented with BAP 0.75 mg.L⁻¹ and AIA 0.1 mg.L⁻¹. The explants were sampled with a frequency of 11 days during 44 days of culture. The samples were processed and stained with Safranin-Fast Green technique. In different slides, it was observed that the protuberances or “little meristematic nodules” formed have a pluri-tissular origin. In several cases, meristematic cellular divisions began from epidermal and sub-epidermal tissues, while in other cases, the vascular parenchymatic tissues began to develop with continued anticlinal and periclinal cell divisions until forming the nodular structures. Also, it was demonstrated that the most important morphogenic ability of guava leaves takes place at the main vein and it is generally associated with the wounded region. On the other hand, it was confirmed that protuberances are nodular structures organized in meristematic centres which achieve a high differentiation stage that allows independence and the reorganization of a new caulinar meristem. With these results, it was possible to verify that the adventitious regenerated shoots from leaves of *in vitro* cultured plantlets of guava have an indirect organogenic origin.

Key words: plant tissue, *in vitro* regeneration, shoots, guava, tissue culture, organogenesis

RESUMEN. Se realizó un estudio histológico del proceso de regeneración de brotes adventicios en hojas de plántulas de guayabo (*Psidium guajava* L.) cultivadas *in vitro*, con el objetivo de determinar el mecanismo morfogenético que da lugar a los brotes regenerados, así como demostrar el papel de la herida en este proceso. Luego de un período de cultivo *in vitro*, las hojas de los brotes apicales se separaron por el pecíolo, se le realizaron varios pinchazos a lo largo del nervio central y se colocaron con polaridad axial en frascos de cultivo que contenían 25 mL de medio de regeneración de brotes MS suplementado con 0.75 mg.L⁻¹ de BAP y 0.1 mg.L⁻¹ de AIA. Estos explantes se muestrearon con una frecuencia de 11 días hasta hacer los 44 días de cultivo. Las muestras fueron procesadas y teñidas con la técnica de doble tinción Safranina-Fast Green. Se pudo observar que las denominadas protuberancias o pequeños nódulos meristemáticos tienen un origen pluri-tissular. Se evidenció que en algunos casos la proliferación de pequeños grupos de células meristemáticas se inició a partir del tejido epidérmico y sub-epidérmico, mientras que en otros el tejido parenquimático perivasculoso comenzó a desarrollar una serie de divisiones anticlinales y periclinales, que dieron lugar a deformaciones en el nervio central hasta formar estructuras nodulares. Se demostró que en las hojas del guayabo la principal actividad morfogenética ocurre en los tejidos que conforman el nervio central y está asociada fundamentalmente a las zonas donde se produce una herida. Por otro lado, se comprobó que las protuberancias son estructuras nodulares organizadas en centros meristemáticos, que alcanzan en ocasiones un estado de diferenciación tal que le permite la organización de un meristemo caulinar, el cual da lugar a un brote. Con estos resultados se pudo verificar que los brotes originados a partir de las hojas del guayabo cultivadas *in vitro* tienen un origen organogénico indirecto.

Palabras clave: tejidos vegetales, regeneración *in vitro*, brotes, guayaba, cultivo de tejidos, organogénesis

Ms.C. Lelurllys Nápoles, Especialista; O. Concepción, Investigador Agregado del Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos; Ninel Peralta, Reserva Científica; Ms.C. Aurora T. Pérez, Investigador; Dr.C. R. Trujillo, Investigador Auxiliar y Profesor Titular del Laboratorio de Ingeniería Metabólica, Centro de Bioplasmas; P. Marrero, Profesor Auxiliar del Departamento de Botánica, Facultad de Agronomía, Universidad de Ciego de Ávila, carretera a Morón, km 9, Ciego de Ávila, CP 69 450, Cuba.

✉ Inapoles@bioplasmas.cu

INTRODUCCIÓN

Varios problemas afectan el cultivo del guayabo (*Psidium guajava* L.) desde diferentes perspectivas. Entre estos se destacan el ataque de numerosas plagas y enfermedades, así como la acelerada maduración de los

frutos. Entre las plagas más sobresalientes están el “Bicho de San Juan” o Mosca Antillana de las Frutas (*Anastrepha mombipraeoptans* Sein) y los nematodos de los géneros *Meloidogyne* y *Pratylenchus* (1). También existe una maduración acelerada de los frutos que dificulta el proceso de poscosecha y trae consigo que las exportaciones, por parte de los países productores, sean muy limitadas (2). En este contexto, las técnicas biotecnológicas y, en particular, aquellas concernientes a la regeneración *in vitro* de plantas completas, constituyen una vía alternativa que podrían complementar satisfactoriamente los métodos convencionales de propagación y, además, permitirían abordar con mayor efectividad los programas de mejoramiento genético, conservación e intercambio seguro de germoplasma en esta especie.

Para la aplicación de estas técnicas se requiere de una adecuada selección de tejidos somáticos con capacidad regenerativa. En más de una ocasión se han utilizado las hojas como material vegetal, con potencial capaz de regenerar plantas tanto por organogénesis (3, 4, 5) como por embriogénesis somática (6, 7, 8). En algunos casos, la respuesta morfogénica de las hojas ha resultado superior a la de otros explantes, como es el caso de los segmentos de hipocótilos en el marigol (9).

En la guayaba, se observó e informó por primera vez la regeneración de brotes a partir de hojas e hipocótilos de plántulas de guayabo germinadas *in vitro* (10), lo cual no ocurrió en las hojas del material procedente de los injertos. Estas observaciones ocurrieron durante los experimentos llevados a cabo para desarrollar un protocolo de micropropagación en esta especie, y nunca fue publicada la optimización de dicho proceso. En trabajos más recientes, también se utilizaron segmentos de hipocótilo procedentes de plántulas de guayabo germinadas *in vitro* (11). Aunque este protocolo suple algunas necesidades, no constituye una herramienta completa, pues al partir de semillas, lleva implícita la variabilidad genética propia de la reproducción sexual en esta especie, la cual posee hasta un 35 % de polinización cruzada (12).

Los intentos por llevar a cabo la formación de callos y/o regeneración de brotes, a partir de segmentos de hojas utilizando material directamente de campo, fallaron, fundamentalmente a causa de la alta fenolización y poca viabilidad de los explantes (13). Por esta razón, se evaluó la capacidad morfogénica y el papel de la herida, durante la optimización de un procedimiento para la regeneración de brotes adventicios, en hojas de plántulas de guayabo cultivadas *in vitro*, las cuales eran procedentes de yemas de rebrotes de la raíz de árboles de campo (14).

Los mecanismos a través de los cuales se producen las nuevas plantas son variados; de ahí que se requiera de un estudio histológico, con el fin de comprender los procesos morfogénicos que ocurren (15). Este conocimiento es fundamental para conocer la estabilidad genética de los materiales producidos y determinar los posibles usos de los tejidos generados en las técnicas de micropropagación o mejoramiento genético (16).

Teniendo en cuenta que los informes anteriores carecen de una validación histológica que permita esclarecer el origen celular de las protuberancias, el papel de la herida en el desarrollo de dichas estructuras y el origen directo o indirecto de los brotes, es que se lleva a cabo el presente trabajo, el cual tiene como objetivo realizar el estudio histológico del proceso de regeneración de brotes adventicios en hojas de plántulas de guayabo (*P. guajava* L.) cultivadas *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones generales. Este estudio se realizó con el cultivar de guayabo Enana Roja Cubana. Los explantes iniciales para el cultivo *in vitro* se colectaron a partir de plantas élites adultas, cultivadas y seleccionadas en el campo de la Estación Experimental “Juan Tomás Roig” de la Universidad de Ciego de Ávila.

Se realizaron el establecimiento y cultivo *in vitro* de las yemas de rebrotes de la raíz. El material vegetal se incubó en cámara de luz artificial, para el control del fotoperíodo de 16 horas luz y ocho horas de oscuridad, con una intensidad luminosa de aproximadamente $12.5\text{--}37.5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y temperatura de $26\pm 1^\circ\text{C}$.

Material vegetal y condiciones de cultivo *in vitro* para la regeneración de brotes. Se utilizó como material vegetal, las hojas separadas por el peciolo de brotes de guayabo enraizados *in vitro*, con aproximadamente 2.0 cm de altura y dos pares de hojas abiertas individualizadas y enraizadas. A las hojas se les realizaron cinco heridas en forma de pinchazos a lo largo del nervio central y se colocaron con polaridad axial en frascos de cultivo, que contenían 25 mL de medio de regeneración de brotes MS (18) suplementado con $0.75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP (6-benzilaminopurina) y $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIA (ácido 3-indolacético) con un pH 5.8 y gelificado con agar 7.5 %. Los frascos de cultivo se incubaron en la cámara de luz artificial en condiciones similares a las descritas anteriormente.

Muestreo y proceso histológico. Se tomaron cinco hojas pinchadas a lo largo del nervio central cada 11 días, contando desde el momento cero en que fueron sembradas, hasta los 44 días de cultivo. Un control en el momento cero (antes de realizar las heridas y sembrar) fue muestreado también. Para conservar la estructura de los tejidos, todas las muestras se fijaron entre 24-48 horas en FAA [formalina (5 %) - ácido acético (5 %) - alcohol etílico (90 %)]. Luego se lavaron en agua corriente durante 24 horas para eliminar el exceso de fijador. Una vez concluido el lavado, el tejido fue deshidratado en soluciones seriadas de alcohol etílico (50, 75, 85 y 95 %) sucesivamente cada dos horas. Posteriormente, las muestras se pasaron tres veces por alcohol etílico puro, durante dos horas en los dos primeros pases y durante toda la noche en el último pase. Luego, se realizaron tres inmersiones en xilol por dos horas en cada pase y se embebieron en tres pases de parafina cada dos horas. A continuación las muestras se incluyeron en bloques de parafina, a los

que se les realizaron cortes seriados con un grosor de 5-8 μm , en un micrótopo de deslizamiento vertical. Los cortes fueron teñidos con la técnica de doble tinción Safranina-Fast Green (19). Para la observación de las muestras se utilizó un microscopio Axioskop OPTON y las imágenes se tomaron con una cámara digital Canon Power Shot G5, adaptada al microscopio. Otras observaciones se realizaron mediante la adaptación de la cámara digital a un estereoscopio Stemi SV6 OPTON.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Observaciones. Como se puede apreciar en la secuencia de imágenes de la Figura 1A-C, la regeneración de brotes ocurrió de manera exitosa. En la Figura 1A, se muestran las protuberancias o callos formados en el envés de la hoja, especialmente en la región del nervio central, asociado siempre a la herida. En la Figura 1B, se observa la presencia de brotes surgidos a partir de las protuberancias en la cara adaxial del nervio central de la hoja y, en la Figura 1C, se puede apreciar una gran cantidad de brotes después de los 60 días de iniciado el cultivo. La presencia de estos brotes en las zonas donde se realizaron los pinchazos y aparecen las protuberancias, hace suponer la ocurrencia de una "organogénesis indirecta" en las hojas de brotes enraizados de guayabo. Sin embargo, el estudio histológico es el que permite discernir esta interrogante.

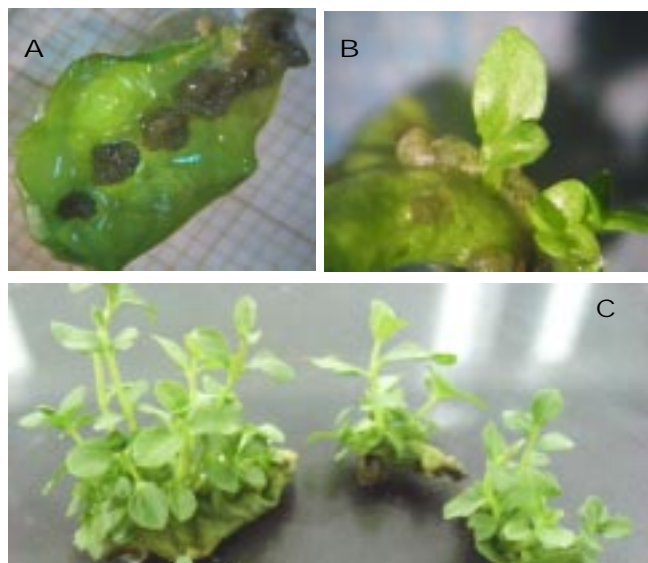


Figura 1. Secuencia de imágenes de la regeneración de brotes en hojas de guayabo. A) Vista del envés de la hoja donde se muestran las protuberancias o callos formados en la región de las heridas en el nervio central (15 días de cultivo). B) Formación del brote asociado a las protuberancias. C) Vista general del desarrollo de los brotes luego de 60 días de cultivo *in vitro*

La organogénesis involucra el desarrollo de un brote apical o radicular, directamente a partir del explante o indirectamente a partir de un tejido indiferenciado denominado callo (20). Los grupos de células en división o meristemoides se asemejan a meristemas reales y tienen uniones vasculares con el callo el tejido contiguo. En condiciones adecuadas de cultivo se pueden formar yemas caulinares o raíces primarias.

Casos exitosos de formación de brotes en especies leñosas por organogénesis en hojas, se pueden encontrar en gran cantidad de cultivos como son: *Pyrus communis* L. (21); *Echinacea purpurea* L. (22); *Punica granatum* L. (23); *Prunus* sp. (24) y *Eucalyptus* sp. (25).

Estudio histológico. En la Figura 2A-H se observa una secuencia histológica de la formación de las protuberancias en las hojas de guayabo, la cual abarca los diferentes momentos de muestreo establecidos en este experimento.

Momento 0. En la Figura 2A, se muestra un corte de la sección transversal de la hoja intacta en el momento cero, o sea, antes de realizar las heridas (pinchazos) y ser colocadas en el medio de regeneración de brotes. En esta lámina se destaca la anatomía foliar del guayabo, en la cual se observa una capa de células epidérmicas, una o dos capas de células de parénquima clorofílico empalizada y dos de parénquima clorofílico esponjoso en el mesófilo. Se observa, además, la presencia de tejidos vasculares (xilema y floema), así como de bolsas lisígenas sub-epidérmicas, muy características en esta especie. Este último aspecto es poco usual, pues para otras especies las condiciones de cultivo *in vitro* provocaron cambios anatómicos foliares importantes, que conllevaron a la pérdida de algunas estructuras a nivel de epidermis (26).

En la región del nervio central de las hojas del guayabo, también se observa el tejido parénquima perivascular (TPV) (Figura 2A). Este tejido está caracterizado por una zona de mayor proporción en la parte inferior del nervio central (AD: región adaxial de la hoja) y una de menor tamaño en la parte superior (AB: región abaxial de la hoja) (Figura 2B).

A los 11 días. En la Figura 2C, se muestra la sección transversal del nervio central de la hoja de guayabo, en la región adaxial o envés a los 11 días de iniciado el cultivo *in vitro*. Se puede observar claramente que las protuberancias o pequeños callos meristemáticos tienen un origen pluri-tisular. En algunos casos, se inicia la proliferación de pequeños grupos de células meristemáticas a partir del tejido epidérmico y subepidérmico, mientras que en otros, el tejido parénquima perivascular comienza a desarrollar una serie de divisiones anticlinales y periclinales, que dan lugar a deformaciones en el nervio central hasta formar estructuras semejantes a nódulos. De igual forma ocurre en la región adaxial o del haz de la hoja (Figura 2D), donde se observa también la formación de protuberancias a lo largo del nervio central y en la región proximal de los semilimbos.

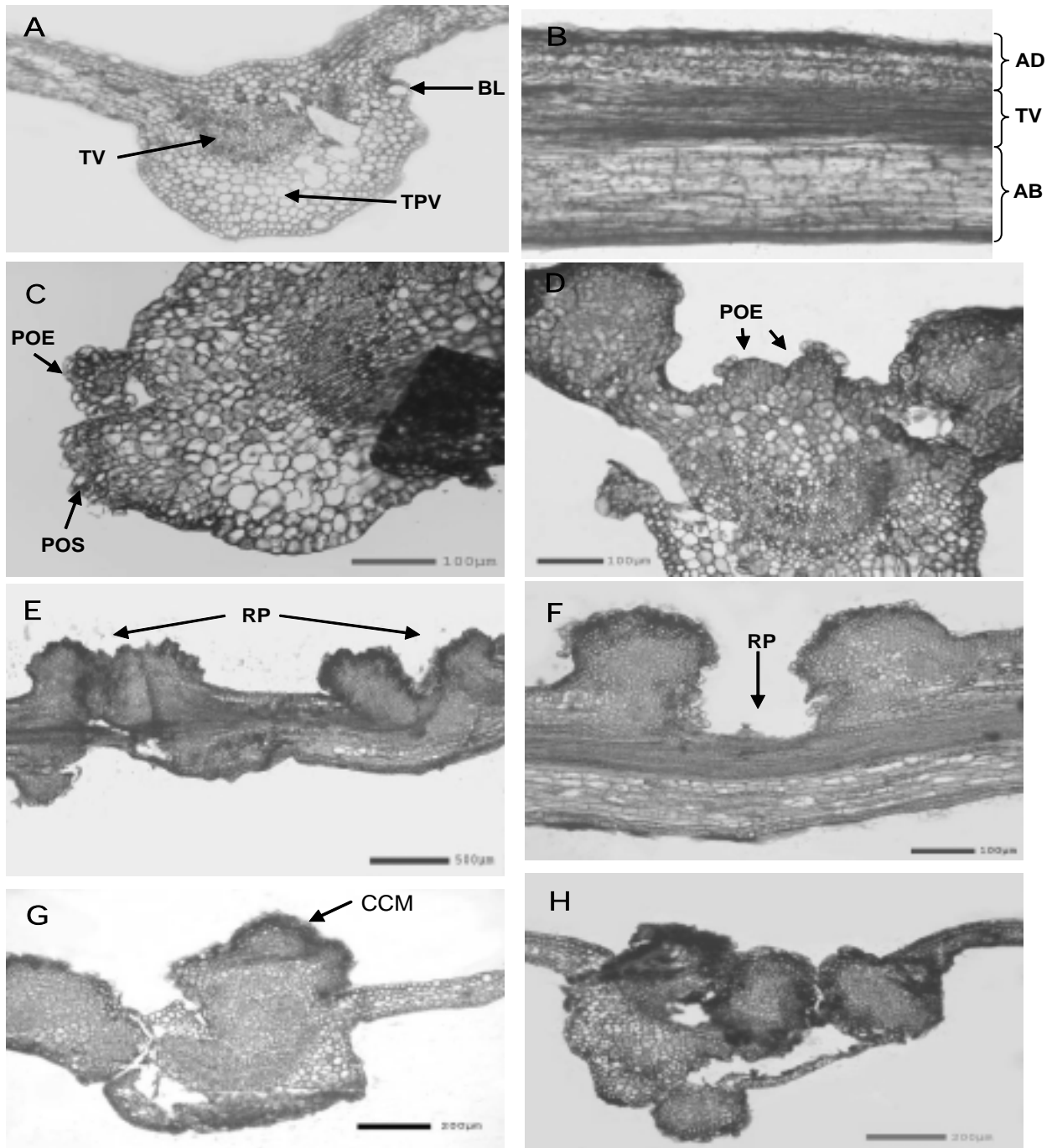


Figura 2. Secuencia histológica de la formación de protuberancias en hojas de plántulas de *P. guajava* L. cultivadas *in vitro*. A) y B) Secciones transversal y longitudinal respectivamente, del nervio central de la hoja intacta antes de iniciar el cultivo. C) y D) Secciones transversales del nervio central a los 11 días de iniciado el cultivo, vista de la cara abaxial (C) y de la cara adaxial (D). E) y F) Secciones longitudinales del nervio central a los 22 días de cultivo; se observa la formación de protuberancias asociada siempre a la región del pinchazo. Cuando la aguja no profundizó lo suficiente en el nervio central (F) el tejido no afectado (parte abaxial) no formó protuberancias. G) y H) Secciones transversales del nervio central de la hoja a los 33 y 44 días de iniciado el cultivo *in vitro*, respectivamente; se observa que el crecimiento de las protuberancias es limitado y que estas sobresalen del resto del explante. (TV: tejido vascular, BL: bolsas lisígenas, TPV: tejido parénquima perivascular, AB: región abaxial del nervio central, AD: región adaxial del nervio central, POE: protuberancia de origen epidérmico, POS: protuberancia de origen subepidérmico, RP: región del pinchazo, CCM: capa de células meristemáticas en la periferia de la protuberancia)

La principal actividad morfogénica de las hojas de guayabo, observada en este trabajo, ocurre en los tejidos que conforman el nervio central. La capacidad morfogénica de las células de los tejidos, epidérmico y subepidérmico, así como de las células del tejido perivascular, se demostró en estudios histológicos realizados durante la regeneración de brotes en hojas *in vitro* de pera silvestre (21), los cuales aseguran que la alta densidad de tejidos vasculares que existe en la región del nervio central, es la principal causa de la elevada respuesta morfogénica que posee esta estructura. Esta observación justifica también el hecho en la respuesta de las hojas del guayabo.

A los 22 días. De manera general, se pudo comprobar a los 22 días que la formación de las estructuras meristemáticas nodulares o protuberancias están siempre asociadas a la herida (Figura 2D). Tan es así, que cuando la herida no llegó a profundizar suficientemente y solo cortó parte del nervio central (Figura 2F), la región no cortada no respondió a la formación del callo o protuberancia. En esta figura se observa también cómo los elementos traqueales, por tratarse de células muertas, no responden al estímulo hormonal ni al estrés provocado por la herida.

La capacidad morfogénica de algunos tejidos puede pasar desapercibida, debido a la asociación de estos con los tejidos diferenciados que están dentro de un sistema organizado. Por ello, en la mayoría de las ocasiones, las heridas permiten poner en contacto directo algunos tejidos internos con el medio de cultivo y facilitar la absorción de los reguladores del crecimiento (20). El papel de la herida, como factor de estrés que promueve el desarrollo morfogénico *in vitro*, es conocido en la literatura. Algunos aseguran que la herida por sí sola es una señal significativa de inducción de la diferenciación celular (27). Muchos de los genes expresados en protoplastos de hojas recién aisladas, no solo aquellos que están involucrados en la respuesta al estrés, son inducidos generalmente como respuesta a la herida (28).

Se conoce una amplia diversidad de señales que desencadenan las heridas en las plantas superiores. Entre estas se destacan el flujo de iones, las especies reactivas de oxígeno, cascadas de fosforilación de proteínas, el ácido jasmónico, etileno, ácido abscísico, ácido salicílico, las señales de péptidos, los compuestos glicanos y otras señales hidráulicas o eléctricas (29). De esta forma, la herida promueve como mecanismo de defensa una respuesta morfogénica en los tejidos vegetales; al respecto existen varios ejemplos: en *Prunus armeniaca* L. (albaricoque), la respuesta morfogénica ocurre principalmente en los bordes cortados y nervios de las hojas, asociada siempre a los tejidos vasculares (3). Algo similar ocurre en la regeneración de brotes de *Platanus acerifolia* Willd, donde los brotes se originan principalmente a partir de callos formados alrededor de los extremos cortados del pecíolo y a lo largo de los cortes transversales de la nervadura central (4). Se han realizado varios cortes transversales pequeños en el nervio central de las hojas de peras silvestres, para mejorar la eficiencia en la regeneración *in vitro* de brotes (21).

La importancia de las heridas en las hojas del guayabo, para promover la formación de las protuberancias y la diferenciación de los brotes, se puso de manifiesto con anterioridad (14). No obstante, el análisis histológico realizado en este estudio ha permitido confirmar este hecho con mayor certeza.

A los 33 y 44 días. El crecimiento de las estructuras meristemáticas o protuberancias es limitado y ya entre los 33 y 44 días detienen su crecimiento, quedando conformado un pequeño callo en forma nodular. La función básica de la mitosis dentro de un proceso morfogénico es la formación de un número definido de células en división activa, las cuales son capaces de responder luego a señales del desarrollo (30). Por su apariencia nodular y el relieve sobresaliente que logran estos nódulos del tejido del explante inicial (Figuras 2G y 2H), es que se les dio la denominación de *protuberancias* la primera vez que se publicó la observación de estas estructuras en el guayabo (10), en el que aseguraron que la separación mecánica de las hojas con protuberancias y su posterior cultivo, daba lugar a nuevos brotes, lo cual demostraba su capacidad morfogénica. Sin embargo, no realizaron un análisis histológico del proceso y, por tanto, especularon sobre el origen de los brotes. De igual forma ocurrió para la regeneración de brotes adventicios en segmentos de hipocótilos de guayabo (11).

La superficie adaxial de la hoja del guayabo es la que con mayor frecuencia ofrece muestras de un potencial morfogénico superior. Las células subepidérmicas de la superficie adaxial se dividen anticlinalmente, para formar el parénquima clorofílico en empalizada de la hoja durante el crecimiento, mientras que el resto de las células de este tejido no sufren cambios y son las que dan origen al parénquima clorofílico esponjoso. Entonces, en condiciones inductivas favorables, las células que deberían formar el parénquima clorofílico en empalizada continúan dividiéndose, formando así una capa de células meristemáticas (Figura 2G, flecha), tal y como ocurre en su pariente la *Feijoa sellowiana* Berg (31). Esta capa está compuesta por células pequeñas con núcleos grandes y citoplasma denso. Estas células mitóticamente activas se tiñen más intensamente, debido a una mayor cantidad de ácidos nucleicos y proteínas. En este estudio se observa que morfológicamente esta es la capa de células que ocupa la región superficial de las protuberancias, las cuales se desarrollan mayormente sobre los nervios central y secundarios de las hojas del guayabo.

Algunos sugieren que la formación de áreas meristemáticas a partir de células poco diferenciadas, como el parénquima (16), ocurre en algunos casos debido a la proximidad de estas últimas con tejidos meristemáticos existentes como el procambium, donde se asume que la concentración de los reguladores del crecimiento es mayor. Esta hipótesis podría explicar por qué, en el presente trabajo, la capa de células meristemáticas se forma principalmente sobre los nervios central y secundarios de las hojas, caso que también ha sido citado en *Psychotria acuminata* (16).

Al analizar la secuencia histológica de la diferenciación del brote que aparece en la Figura 3A-F, se puede confirmar la hipótesis planteada anteriormente sobre el desarrollo alcanzado por las protuberancias en su crecimiento. Así, en la Figura 3A, se puede apreciar claramente la sección transversal de una protuberancia separada del explante inicial que ha logrado un nivel de organización mayor, donde aparecen tejidos como la protodermis y el procambium, los cuales le confieren cierta individualidad a este tipo de estructura. También se observó la organización de ápices caulinares con una mayor vinculación al tejido hiperplásico del nervio central deformado (Figura 3B).

Los nódulos o protuberancias continúan su desarrollo e incrementan su nivel de organización, hasta dar lugar a la formación de domos meristemáticos y primordios foliares aproximadamente entre los 22-44 días de cultivo (Figura 3C), constituyendo de esta forma un ápice caulinar. Se observó, además, la formación de ápices caulinares a partir de los nódulos o protuberancias que mostraron un mayor vínculo con el explante inicial y que provocaron la deformación del nervio central de la hoja. Sin embargo, no se distinguió conexión vascular entre estos (Figura 3D), lo cual confirma el origen indirecto del nuevo órgano en formación.

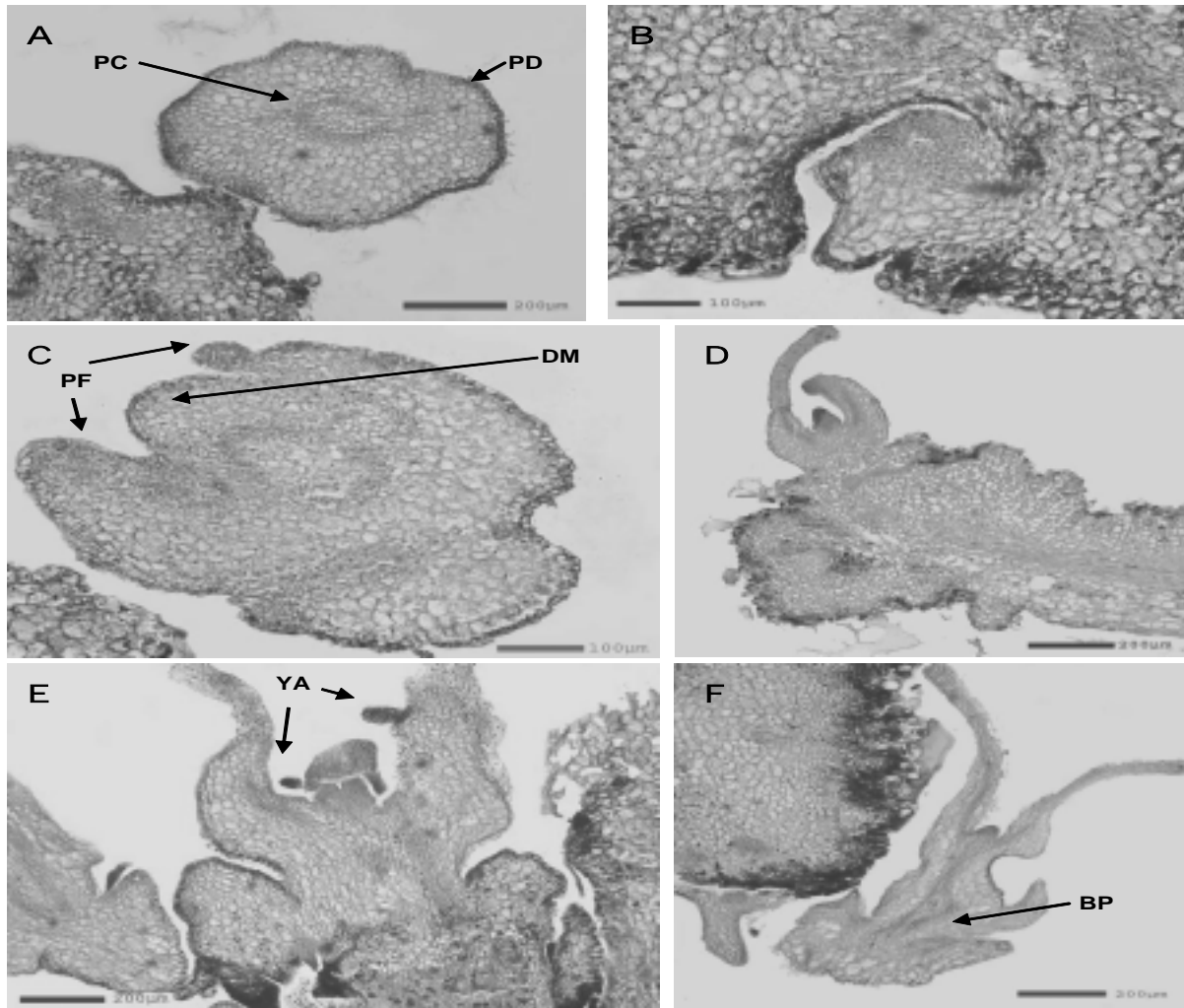


Figura 3. Secuencia histológica de la formación de brotes en hojas de plántulas de *P. guajava* L. cultivadas *in vitro*. A) Sección transversal de una protuberancia prácticamente separada del tejido inicial, con un alto grado de organización celular, nótese la presencia de tejidos similares a la protodermis (PD) y al procambium (PC). B) Organización de un ápice meristemático dentro del tejido matricial del callo. C) Sección longitudinal de una protuberancia separada que muestra la formación del domo meristemático (DM) y la presencia de los primordios foliares en desarrollo (PF), al cabo de 33 días de iniciado el cultivo. D) Sección longitudinal del nervio central de la hoja y de un ápice caulinar formado a partir de este a los 44 días de iniciado el cultivo. E) Sección longitudinal de un brote caulinar con la presencia de cuatro primordios foliares y yemas adventicias bien definidas (YA). F) Sección longitudinal de un brote que se ha desprendido completamente del explante inicial, luego de 44 días de cultivo (BP: bandas procambiales)

En muchos de los brotes formados se observó la presencia de yemas adventicias y axilares, las cuales pueden dar lugar a la formación de nuevos brotes. Sin embargo, en ninguna de las muestras procesadas se observó la formación de brotes múltiples o malformados. Este hecho debió estar asociado al efecto del BAP como citoquinina, pues para el guayabo y a diferencia del TDZ, por ejemplo, este regulador del crecimiento da lugar a brotes mejor definidos y con primordios de hojas mejor desarrollados (32).

Finalmente, se observó que los brotes formados guardan una débil conexión con el explante y en ocasiones ocurrió un desprendimiento del brote relativamente fácil durante la manipulación de la muestra y el procesamiento histológico (Figura 3F). Con estos resultados se pudo verificar que los brotes adventicios, originados a partir de las hojas del guayabo cultivadas *in vitro*, tienen un origen organogénico. Existen varios trabajos en los que se demuestra que las células subepidérmicas dan origen a brotes caulinares a través de un proceso organogénico (16, 33).

CONCLUSIONES

De manera general, se demostró que en las hojas del guayabo existe una gran actividad morfogénica en los tejidos que conforman el nervio central. Que esa actividad está asociada fundamentalmente a las zonas donde se produce una herida. Además, se demostró que las protuberancias tienen un origen pluri-tisular, en función de aquellos tejidos que son afectados por la herida y que se trata de estructuras nodulares organizadas en centros meristemáticos, que alcanzan en ocasiones un estado de diferenciación, que le permite independencia y con ello la organización de un meristemo caulinar, el cual da lugar al brote, todo a través de un proceso de organogénesis indirecta.

REFERENCIAS

- Peña, H. A.; Díaz, J. A. y Martínez, T. R. Fruticultura tropical. La Habana:ICFES, 1996. 208 p.
- McGuire, R. G. y Hallman, G. J. Coating guavas with cellulose-or carnauba-based emulsions interferes with postharvest ripening. *HortScience*, 1995, vol. 30, no. 2, p. 294-295.
- Pérez-Tornero, O.; Egea, J.; Vanoostende, A. y Burgos, L. Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. *Plant Science*, 2000, vol. 158, p. 61-70.
- Liu, G. y Bao, M. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of London plane tree (*Platanus acerifolia* Willd.). *Plant Cell Reports*, 2003, vol. 20, no. 7, p. 640-644.
- Gentile, A.; Monticelli, S. y Damiano, C. Adventitious shoot regeneration in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Plant Cell Report*, 2003, vol. 20, no. 11, p. 1011-1016.
- Hamama, L.; Baaziz, M. y Letouze, R. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissue of joboba. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2001, vol. 65, no. 2, p. 109-113.
- Nowak, B. y Miczynski, K. The course and efficiency of organogenesis on leaf explant of plum 'Wegierka zwykla' (*Prunus domestica* L.) induced by cytokinins. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Biotechnology*, 2002. 5 (1): 1-6. [Consultado 16-3-2004]. Disponible en <http://www.ejpau.media.pl.>
- Toribio, M.; Fernández, C.; Celestino, C.; Martínez, M. T.; San-José, M. C. y Vieitez, A. M. Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2004, vol. 76, p. 283-287.
- Vanegas, P. E.; Hernández, A. C.; Valverde, M. E. y Paredes-López, O. Plant regeneration via organogenesis in marigold. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002, vol. 69, p. 279-283.
- Loh, C. S. y Rao, A. N. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from seedlings and grafted plants and adventitious shoot formation *in vitro*. *Scientia Hort.*, 1989, vol. 39, p. 31-39.
- Singh, S. K.; Meghwal, P. R.; Sharma, H. C. y Singh, P. S. Direct shoot organogenesis on hypocotyl explants from *in vitro* germinated seedlings of *Psidium guajava* L. cv. Allahabad Safeda. *Scientia Horticulturae*, 2002, vol. 95, p. 213-221.
- Pontikis, C. A. *Psidium guajava* L. En: Bajaj, Y. P. S. (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry. *Trees IV*, 1996, p. 308-320.
- Ramírez, M. C. y Salazar, E. G. Método de desinfección y efecto de citocininas en el cultivo *in vitro* de segmentos de hojas de *Psidium guajava* L. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 1998. vol. 15, p. 162-173.
- Concepción, O.; Nápoles, L.; Pérez, A.; Peralta, N. y Trujillo, R. Regeneración de brotes adventicios en hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.) cultivadas *in vitro*. *Rev. Col. Biotecnología*, 2004, vol. 6, no. 2, p. 126-135.
- Williams, E. G. y Maheswaran, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cell on embryogenic group. *Annals of Botany*, 1986, vol. 57, p. 443-462.
- Lara, A.; Valverde, R. y Gómez, L. Histología de embriones somáticos y brotes adventicios inducidos en hojas de *Psychotria acuminata*. *Agronomía Costarricense*, 2003, vol. 27, no. 1, p. 37-48.
- Nápoles, L. Micropropagación *in vitro* del guayabo (*Psidium guajava* L.) var. Enana Roja Cubana EEA 18-40, a partir de yemas de campo. [Tesis de Maestría]; Universidad de Ciego de Ávila. 2003. p. 67.
- Murashige T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15, p. 473-479.
- Johansen, D. J. Plant microtechnique. New-York : Mc Graw-Hill, 1940.
- George, E. F. Plant propagation by tissue culture. Exegetics. 1993. 524 p.
- Caboni, E.; Tonelli, M. G.; Lauri, P.; D'Angeli, S. y Damiano, C. *In vitro* shoot regeneration from leaves of wild pear. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1999, vol. 59, p. 1-7.
- Koroch, A.; Juliani, H. R.; Kapteyn, J. y Simon, J. E. *In vitro* regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002, vol. 69, no. 1, p. 79-83.

23. Naik, S. K. y Chand, P. K. Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine promote *in vitro* adventitious shoot regeneration of pomegranate (*Punica granatum* L.). *J. of Plant Physiol.*, 2003, vol. 160, no. 4, p. 423-430.
24. Pascual, L. y Marín, J. A. A liquid 2,4-D pulse increased shoot and root regeneration from leaf explants of adult *Prunus* rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 2005, vol. 106, no. 4, p. 582-592.
25. Glocke, P.; Collins, G. y Sedgley, M. 6-Benzylamino purine stimulates *in vitro* shoot organogenesis in *Eucalyptus erythronema*, *E. stricklandii* and their interspecific hybrids. *Scientia Horticulturae*, 2006, vol. 109, no. 4, p. 339-344.
26. Fréitez, Y. H. y Páez de Cásare, J. Anatomía foliar comparada de plantas de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) cultivadas en tres ambientes de crecimiento. *Bioagro*, 2004, vol. 16, no. 1, p. 27-30.
27. Fehér, A.; Pasternak, T. P. y Dudits, D. Transition of somatic plant cell to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, vol. 74, p. 201-228.
28. Pasternak, T.P.; Prinsen, E.; Ayaydin, F.; Miskolczi, P.; Potters, G.; Asard, H.; Van Onckelen, H.; Dudits, D. y Fehér, A. 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.*, 2002, vol. 129, p. 1807-1819.
29. Bruxelles, G. de y Roberts, M. R. Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2001, vol. 20, no. 5, p. 487-521.
30. Villalobos, V. M. y Thorpe, T. A. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Roca, W. M. y Mrogrinski, L. A. (Eds). Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones prácticas. CIAT. 1991. p. 127-142.
31. Canhoto, J. M. y Cruz, G. S. Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple-guava (*Feijoa sellowiana* Berg). *Protoplasma*, 1996, vol. 191, p. 34-45.
32. Pérez, A.T.; Nápoles, L.; Concepción, O. y Trujillo, R. Multiplicación *in vitro* de brotes de guayabo (*Psidium guajava* L.) cv. Enana Roja Cubana obtenidos a partir de semillas. *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 3, p. 57-61.
33. Mitra, S. y Mukherjee, K. Direct organogenesis in Indian spinach. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2001, vol. 67, no. 2, p. 211-215.

Recibido: 6 de diciembre de 2005

Aceptado: 23 de noviembre de 2006