

Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2015, 32: 209-230

Determinación de parámetros de cultivo en la germinación de embriones somáticos de *Psidium guajava* L. en sistemas de inmersión temporal de tipo RITA®

Determination of culture parameters in the germination of somatic embryos of *Psidium guajava* L. in temporary immersion systems RITA® type

J. Vilchez¹ y N. Albany²

¹Departamento de Botánica, Laboratorio de Fisiología Vegetal “Merylin Marín”. ²Departamento de Química. Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, AP 15205, Maracaibo, Estado Zulia (4005ZU), República Bolivariana de Venezuela.

Resumen

El éxito de la embriogénesis somática en especies leñosas depende de la fase de geminación y esta fase depende en gran medida a la calidad de los embriones somáticos, que puede ser mejorada en condiciones de humedad relativa reducida, provistas por los sistemas de cultivos *in vitro* ventilados, como los sistemas de inmersión temporal (SIT). Por esto, se planteó en esta investigación determinar los parámetros de cultivo para la germinación de embriones somáticos de guayabo (*Psidium guajava* L.), cultivar “Enana Roja Cubana EEA-1840” en SIT tipo RITA®. Se realizaron tres ensayos, en un primer ensayo se comparó la germinación de embriones somáticos en RITA® y en medio semisólido. En un segundo ensayo se determinó el tiempo y frecuencia de inmersión adecuados para la germinación de los embriones en RITA®. Y en un tercer ensayo se determinó la densidad de inoculo para la germinación de los embriones. El número de embriones germinados en los RITA® (89,6) fue tres veces superior en comparación con el medio semisólido (30). Se determinó que los parámetros de tiempo y frecuencia de inmersión adecuados para la germinación de embriones somáticos son 1 ó 2 min. de inmersión cada 12 h. La densidad de inoculación tuvo efecto sobre el número de embriones germinados y con 500 mg de masa fresca se obtuvo el mayor número de embriones somáticos germinados. Se concluye que el cultivo en SIT tipo RITA® mejoró la germinación de embriones somáticos de guayabo.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, densidad de inoculo, embriogénesis somática, Enana Roja Cubana.

Recibido el 2-3-2015 • Aceptado el 8-6-2015

Autor de correspondencia e-mail: jvilchezp@fa.luz.edu.ve; nalbany@fa.luz.edu.ve

Abstract

The success of somatic embryogenesis in woody species depends on the germination phase. The success of this phase is largely due to the quality of the embryos, which can be enhanced under low relative humidity conditions, provided by ventilation systems for *in vitro* cultures as temporary immersion systems (TIS). Thus, the culture parameters for germination of somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.) cultivar “Red Dwarf Cuban EEA-1840” were determined in TIS type RITA®. Three trials were carried out. In a first trial, the germination of somatic embryos was compared in RITA® and in solid culture. In the second trial, the adequate immersion frequency for embryos germination in RITA® was determined. In a third trial, the density of the inoculums for the germination of the embryos was determined. The number of germinated embryos in RITA® (89.6) was three times higher compared to the semi-solid culture (30). It was determined that the time and frequency parameters suitable for the germination of somatic embryos immersion were 1 or 2 minutes every 12 h. Embryo inoculum density had effect on the number of germinated embryos, and the largest number of germinated embryos was obtained with 500 mg of fresh mass. It is concluded that culture in TIS type RITA® improved germination of guava somatic embryos. **Key words:** culture *in vitro*, inoculum density, somatic embryogenesis, Red Cuban Dwarf.

Introducción

La embriogénesis somática es el proceso por el cual las células somáticas, bajo condiciones inductivas, generan células embriogénicas, que experimentan una serie de cambios morfológicos y bioquímicos, que resulta en la formación de embriones somáticos (Komamine *et al.*, 2005). Una característica llamativa del embrión somático es su crecimiento continuo, resultante de la ausencia de detención del desarrollo (Faure *et al.*, 1998). Esta característica hace a la embriogénesis somática una herramienta muy valiosa para el logro de una amplia gama de conocimientos en el área, de bioquímica básica, fisiología, estudios morfológicos y para el desarrollo de tecnologías con un alto

Introduction

Somatic embryogenesis is the process by which the somatic cells under inductive conditions generate embryogenic cells, all of which undergo a series of morphological and biochemical changes that result in the formation of somatic embryos (Komamine *et al.*, 2005). A striking feature of the somatic embryo is its continuous growth, resulting in a lack of detention of the development (Faure *et al.*, 1998). This feature makes the somatic embryogenesis a very valuable tool for the achievement of a wide range of knowledge in the area of biochemistry, physiology, morphological studies and for the development of technologies with a high degree of practical application

grado de aplicación práctica (Sánchez *et al.*, 2005; Santa-Catarina *et al.*, 2012; Von Arnold *et al.*, 2002).

Entre las aplicaciones prácticas de la embriogénesis somática está la propagación masiva comercial de plantas, a través de la multiplicación de propágulos embriogénicos (Merkle *et al.*, 1990); pero en leñosas las bajas tasas de germinación de embriones somáticos y de conversión en plantas es una limitación grave (Lee *et al.*, 2001). Estas limitaciones son causadas a una pobre o poca calidad de los embriones somáticos, falta de adecuada maduración y baja tolerancia a la desecación (Gómez-Kosky, 1998; Merkle *et al.*, 1995). En este sentido Lee *et al.* (1997 y 2001) señalan que las tasas de desarrollo y germinación de embriones somáticos pueden ser mejoradas en condiciones de humedad reducida, inducida por sistemas de cultivos *in vitro* ventilados.

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) han demostrado mejorar la germinación de embriones somáticos en varias especies (Barbón *et al.*, 2014; Mallón *et al.*, 2012), lo cual se explica por el hecho que estos sistemas combinan la ventilación del recipiente de cultivo con el contacto intermitente entre el medio de cultivo y los explantes (Etienne *et al.*, 1997; Georgiev *et al.*, 2014). La ventilación del recipiente de cultivo impide la acumulación excesiva de CO₂ y de etileno (Martre *et al.*, 2001; Roels *et al.*, 2006), gases que tienen efectos negativos sobre el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales; y el contacto intermitente entre la mayor parte o la superficie completa de los propágulos con el medio de cultivo, mejoran la difusión de

(Sánchez *et al.*, 2005; Santa-Catarina *et al.*, 2012; Von Arnold *et al.*, 2002).

Among the practical applications of somatic embryogenesis is the commercial mass propagation of plants, through the multiplication of embryogenic propagules (Merkle *et al.*, 1990); but in woody the low germination rates of somatic embryos and conversion in plants is a serious limitation (Lee *et al.*, 2001). These limitations are caused to a poor or low quality of the somatic embryos, lack of adequate maturation and low tolerance to desiccation (Gómez-Kosky, 1998; Merkle *et al.*, 1995). In this sense Lee *et al.* (1997 and 2001) indicate that the rates of development and germination of somatic embryos can be improved under low humidity conditions, induced by *in vitro* ventilated cropping systems.

Temporary immersion systems (TIS) have shown to improve the germination of somatic embryos in several species (Barbón *et al.*, 2014; Mallón *et al.*, 2012), which is explained by the fact that these systems combine the ventilation of the culture container with intermittent contact between the culture medium and the explants (Etienne *et al.*, 1997; Georgiev *et al.*, 2014). The ventilation of the container surface prevents the excessive accumulation of CO₂, and ethylene (Martre *et al.*, 2001; Roels *et al.*, 2006), gases with negative effects on the growth and development of plant tissues; and the intermittent contact between the greater part or the entire surface of the propagules with the culture medium improve the dissemination of nutrients among these and the culture medium (Martre

nutrientes entre estos y el medio de cultivo (Martre *et al.*, 2001; Watt, 2012). También permiten el control del ambiente gaseoso del recipiente de cultivo, se prolonga el tiempo de subcultivo, facilidad de cambios de medio, con lo cual se reduce la mano de obra y facilitan la automatización (Berthouly y Etienne, 2005; Quiala *et al.*, 2012; Watt, 2012). Además en los SIT con cada emersión (periodo entre cada inmersión) es posible controlar la humedad relativa del recipiente de cultivo permitiendo la desecación de los embriones somáticos y con ello su maduración (Etienne *et al.*, 1997); también se reduce el número de embriones anormales (Tahardi *et al.*, 2003) y se mejora la sincronización del crecimiento de los embriones somáticos (Cabasson *et al.*, 1997; Tahardi *et al.*, 2003).

Entre los parámetros más importantes a determinar en el cultivo en SIT, están el tiempo de inmersión porque controla la absorción de nutrientes y la expresión de la hiperhidricidad en los propágulos (Albarrán *et al.*, 2005; Berthouly y Etienne, 2005); y la frecuencia de inmersión porque de ella depende la renovación del ambiente gaseoso dentro del recipiente de cultivo (Berthouly y Etienne, 2005). Se han reportado diferentes tiempos y frecuencias de inmersión en la germinación de embriones somáticos en especies leñosas como *Citrus* de 1 min cada 4 h (Cabasson *et al.*, 1997), cacao de 1 min cada 8 h (Niemenak *et al.*, 2008), guayaba de 1 min cada 12 h (Vilchez *et al.*, 2001), *Bactris gasipaes* de 3 min cada 6 h (Steinmacher *et al.*, 2011), café de 1 min cada 12 h (Barbón *et al.*, 2014). Otros parámetro a considerar

et al., 2001; Watt, 2012). Additionally, these allow the control of the gaseous environment of the cultivation container, the sub-culture time extends, it gets easy to do changes in the culture which reduce the man power and facilitate the automation (Berthouly and Etienne, 2005; Quiala *et al.*, 2012; Watt, 2012). In addition, in the TIS with each immersion (period between each immersion) it is possible to control the relative humidity of the container cultivation, allowing the desiccation of the somatic embryos and their maturation (Etienne *et al.*, 1997); also the number of abnormal embryos is reduced (Tahardi *et al.*, 2003) and the synchronization of the growth of the somatic embryos is improved (Cabasson *et al.*, 1997; Tahardi *et al.*, 2003). Among the most important parameters to be determined in the crop in TIS, are the immersion time because it controls the absorption of nutrients and the expression of the hyper-hydricity in the propagules (Albarrán *et al.*, 2005; Berthouly and Etienne, 2005); and the immersion frequency because the renewal of the gaseous environment within the cultivation container depends on it (Berthouly and Etienne, 2005). Different times and immersion frequencies have been reported in the germination of somatic embryos in woody species such as citrus of 1 min every 4 h (Cabasson *et al.*, 1997), cocoa 1 min every 8 h (Niemenak *et al.*, 2008), guava 1 min every 12 h (Vilchez *et al.*, 2001), *Bactris gasipaes* 3 min every 6 h (Steinmacher *et al.*, 2011), coffee with 1 min every 12 h (Barbón *et al.*, 2014). Other parameter to be considered in the TIS is the inoculation

en los SIT es la densidad de inoculación, investigadores como Shigeta *et al.* (1996) y De Feria *et al.* (2005) han señalado la densidad de inoculación como un factor importantes para incrementar la producción de embriones somáticos y garantizar elevados porcentajes de germinación, ya que en algunas especies cuando se utilizan elevadas densidades se ha limitado el proceso de diferenciación, pero en otras se favorece la formación y multiplicación de un gran número de embriones somáticos (Barbón *et al.*, 2014).

En base a lo anteriormente expuesto y con el propósito de determinar los parámetros de cultivo para la germinación de embriones somáticos de guayabo (*Psidium guajava* L.) en SIT tipo recipiente de inmersión temporal (RITA[®]), se realizó esta investigación.

Materiales y métodos

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

Embriogénesis somática: se indujo siguiendo el protocolo descrito por Vilchez *et al.* (2002), para lo cual se sembraron embriones cigóticos inmaduros guayabo cultivar “Enana Roja Cubana EEA-1840” en etapa torpedo y cotiledonal. Estos se cultivaron durante ocho semanas en medio de cultivo semisólido Murashige y Skoog, (1962) (MS) y suplementado con 1 mg.L⁻¹ de ácido 2,4 diclorofenoxiacético, 400 mg.L⁻¹ de L-glutamina 150 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico, 6 g.L⁻¹ de sacarosa

density, researchers like Shigeta *et al.* (1996) and De Feria *et al.* (2005) pointed out the inoculation density as an important factor to increase the production of somatic embryos and ensure high germination percentages, since in some species when using high densities the differentiation process has been limited, but in others the formation and propagation of a large number of somatic embryos gets favored (Barbón *et al.*, 2014).

Because of the latter, this research was carried out with the aim of determining the cultivation parameters for the germination of somatic embryos of guava (*Psidium guahava* L.) in TIS container type in temporal immersion (RITA[®]).

Materials and methods

This research was conducted in the facilities of the Biotechnology laboratory “Prof. Silvia Leon of Sierralta” of the Agronomy Faculty of La Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Somatic embryogenesis: was induced following the protocol described by Vilchez *et al.* (2002), for which immature zygotic embryos of guava of the cultivar “Cuban Red Dwarf FSS-1840” were cropped under in torpedo and cotyledon phase. These were cultivated during eight weeks in a semi-solid culture medium Murashige and Skoog (1962) (MS) and supplemented with 1 mg.L⁻¹ acid 2.4 dichlorophenoxyacetic acid, 400 mg.L⁻¹ of L-glutamine 150 mg.L⁻¹ of ascorbic acid, 6 g.L⁻¹ sucrose and gelled with 4 g.L⁻¹ Phytigel (Sigma-Aldrich[®]).

y gelificado con 4 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma-Aldrich®).

En la fase de proliferación el material inicial fue callo con estructuras embriogénicas a los cual se les eliminó los embriones somáticos en etapa torpedo y cotiledonal. Este callo se cultivó en medio de cultivo igual al empleado en la etapa de inducción pero en estado líquido y en agitación a 90 rpm. Semanalmente durante seis semanas se renovó el 50% del medio de cultivo. Para promover la maduración de los embriones somáticos provenientes de la fase de proliferación en medio líquido, estos se cultivaron por cuatro semanas en SIT tipo RITA® (recipiente de inmersión temporal automatizado, CIRAD-Francia, distribuido por VITROPIC, Francia), con un tiempo y frecuencia de inmersión de 1 min cada 8 h. La densidad de inculo en los RITA® en la fase de maduración fue 500 mg de embriones somáticos en etapa de torpedo.

El medio de cultivo utilizado en esta fase fue el MS a la mitad de la concentración de los macronelementos y 30 g.L⁻¹ de sacarosa. Las características y funcionamiento de los RITA® utilizados en fases de maduración y germinación son descritas por Etienne y Berthouly (2002), Martre *et al.* (2001) y Georgiev *et al.* (2014).

Procedimientos generales: El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5,8 con NaOH 1N y HCl 1N según el caso, antes de la esterilización en autoclave a 121°C y 17 PSI durante 20 min. Todas las manipulaciones de los embriones somáticos se realizaron bajo condiciones de asepsia empleando una cámara de flujo laminar horizontal (ESCO®) de aire esterilizado, con un

In the proliferation phase, the initial material was callus with embryogenic structures to which the somatic embryos were eliminated in the torpedo and cotyledonal phase. This callus is cultivated in the middle of a crop equal to the employee in the induction stage but in liquid state and in agitation at 90 rpm. 50% of the culture medium was renewed weekly for six weeks. To promote the maturation of the somatic embryos from the proliferation phase in liquid medium, these were cultivated for four weeks in TIS RITA® type (automated temporary immersion container, CIRAD-France, distributed by VITROPIC, France), with a time and immersion frequency of 1 min every 8 h. The inoculums density in the RITA® in the ripening stage was 500 mg of somatic embryos in the torpedo phase.

The culture medium used in this phase was the MS to half of the concentration of the macronelements and 30 g.L⁻¹ of sucrose. The features and operation of the RITA® used in maturation and germination phases are described by Etienne and Berthouly (2002), Martre *et al.* (2001) and Georgiev *et al.* (2014).

General Procedures: The pH of the culture media was adjusted to 5.8 with 1N NaOH and HCl 1N according to the case, prior to the sterilization by autoclaving at 121°C and 17 PSI for 20 min. All manipulations of the somatic embryos were conducted under aseptic conditions using a horizontal laminar flow camera (ESCO®) of sterile air, with a constant flow 0.5 PSI. The instruments (scalpels and tweezers) were disinfected with NaClO solution

flujo constante 0,5 PSI. El instrumental (pinzas y bisturíes) se desinfectó con una solución de NaClO al 1% i.a. (v/v) durante 15 min y las cápsulas de Petri se esterilizaron en autoclave a 121°C y 17 PSI durante 30 min y seguidamente se secaron en una estufa a 80°C por 8 h. Los cultivos *in vitro* se mantuvieron en un cuarto de crecimiento, bajo luz blanca fluorescente continua con una radiación fotosintéticamente activa de $200 \mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ y humedad relativa promedio de 46 %.

Comparación de la germinación de embriones somáticos en SIT tipo RITA® y en medio semisólido: Para comparar la germinación de embriones somáticos de guayabo, en SIT tipo RITA® y en medio semisólido, se utilizaron tres RITA® de 0,9 L de capacidad con 200 mL de medio de cultivo y 200 mg de embriones somáticos como inóculo. El tiempo y frecuencia de inmersión utilizada en este experimento fue de 1 min cada 8 h. El control del experimento lo constituyeron cinco frascos de vidrio de 200 mL de capacidad, con 25 mL de medio de cultivo gelificado con $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Phytigel (Sigma-Aldrich®), en los cuales se inocularon 25 mg de embriones. La relación (peso.volumen⁻¹) entre la cantidad de inóculo y volumen de medio de cultivo fue de 1 mg de inóculo. mL^{-1} de medio de cultivo, en ambos tratamientos. Las etapas de desarrollo de los embriones somáticos inoculados fueron torpedo y cotiledonal, ambos tipos de embriones de color blanco brillante (figura 1a).

El medio de germinación fue el MS a la mitad de la concentración de los macroelementos, suplementado con

1% a.i. (v/v) for 15 min and Petri capsules were sterilized in an autoclave at 121°C and 17 PSI for 30 min and then dried in an oven at 80°C for 8 h. Crops *in vitro* were kept in a growing chamber under continuous fluorescent white light with photosynthetically active radiation of $200 \mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, temperature of $26 \pm 1^\circ\text{C}$ and average relative humidity 46%.

Germination comparison of somatic embryos in TIS RITA® type and in semisolid culture medium: To compare the germination of somatic embryos of guava in TIS RITA® type and in semisolid medium, three RITA® of 0.9 L capacity with 200 mL of culture medium were used with 200 mg of somatic embryos as inoculum. The time and immersion frequency used in this experiment was 1 min every 8 h. The control of the experiment was constituted by five glass jars of 200 ml capacity, with 25 ml of culture medium gelled with $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of Phytigel (Sigma-Aldrich®), in which 25 mg of embryos were inoculated. The relationship (weight.volume⁻¹) among the amount of the inoculum and the volume of the culture medium was 1 mg of inoculum. mL^{-1} culture medium, in both treatments. The development phases of the somatic embryos inoculated were torpedo and cotyledon, both types of embryos with bright white color (figure 1a).

The germination medium was the MS to half of the concentration of the macroelements, supplemented with $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-benzylaminopurine; $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of DI 31 (analogue brasinoesteroide, $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_5$, equal to Biobras-16) and $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of sucrose.

0,25 mg.L⁻¹ de 6-Bencilaminopurina; 0,01 mg.L⁻¹ de DI 31 (análogo de brasinoesteroide C₂₇H₄₂O₅, equivalente al Biobras-16) y 30 g.L⁻¹ de sacarosa. Luego de ocho semanas de cultivo se evaluó el número de embriones somáticos con desarrollo normal (embriones que presentaron el desarrollo del eje caulinar, hojas cotiledonales y eje radicular, figura 1b), caulinar (embriones que presentaron el desarrollo solo del eje caulinar solamente y hojas cotiledonales, sin visible meristemo radicular activo, figura 1c) y radicular (embriones que presentaron el desarrollo solo del eje radicular, sin meristemo apical activo, figura 1d).

Determinación del tiempo y frecuencia de inmersión para la germinación embriones somáticos en sistemas de inmersión temporal: A fin de establecer los parámetros tiempo y frecuencia de inmersión adecuados, para la germinación de los embriones somáticos en SIT, se evaluaron mediante un experimento factorial, cuatro tratamientos resultantes de la combinación de dos tiempos de inmersión (1 y 2 min) y dos frecuencias de inmersión (12 h y 8 h). Se utilizaron tres repeticiones por tratamiento y cada repetición la constituyó un RITA® de 0,9 L de capacidad; cada uno con 200 mL de medio de cultivo e inoculado con 250 mg de embriones somáticos. El estado de desarrollo de los embriones empleados, así como el medio de cultivo utilizado fueron similares al descrito en el experimento anterior.

A las ocho semanas de cultivo además de evaluar las variables señaladas en el experimento anterior, se determinó en el medio de cultivo, el pH

After eight weeks of culture the number of somatic embryos was evaluated with normal development (embryos that presented the development of stem rot, cotyledon leaves and radicular axis, figure 1b), stem rot (embryos that only presented the development of stem rot and cotyledon leaves without visible active root meristem, figure 1c) and root (embryos that only presented the development of the root axis without active apical meristem, figure 1d).

Determination of the time and immersion frequency for the germination of somatic embryos in temporary immersion systems: in order to establish the adequate time parameters and immersion frequency suitable for the germination of somatic embryos in TIS, these were evaluated using a split plot experiment, four treatments resulting from the combination of two immersion times (1 and 2 min) and two immersion frequencies (12 h and 8 h). Three replicates per treatment were used and each replication was constituted by a RITA® with 0.9 L of capacity; each one with 200 mL of the culture medium and inoculated with 250 mg of somatic embryos. The development phase of the embryos used, as well as the culture medium used were similar to the one described in the previous experiment. Within eight weeks of culture, besides evaluating the variables identified in the previous experiment, in the culture medium were determined the pH and the difference of the sucrose content and mineral salts between the beginning and the end of the experiment. The latter parameters were identified as indirect measures

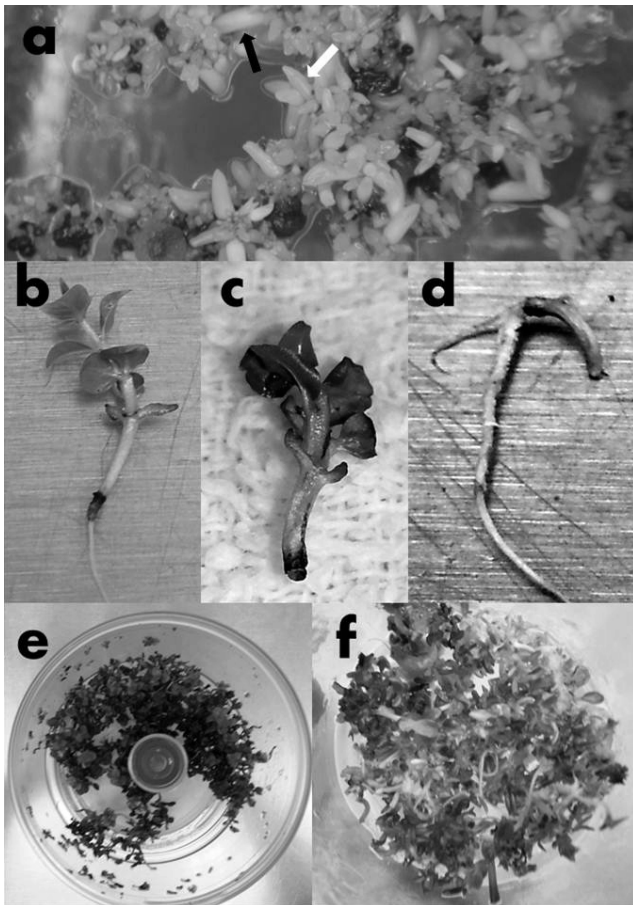


Figura 1. Aspecto general de la germinación de embriones somáticos de *Psidium guajava* L. cv. Enana Roja Cubana EEA-1840 en sistema de inmersión temporal (RITA[®]): (a) Embriones somáticos en etapa torpeda (flecha blanca) y cotiledonal (flecha negra) empleados para inocular los RITA[®], (b) Embriones somáticos con germinación normal, (c) caulinar, (d) radicular, (e) germinación de embriones somáticos en RITA[®] y (f) en medio semisólido.

Figure 1. General appearance of the germination of somatic embryos of *Psidium guajava* l. cv. Cuban Red Dwarf FSS-1840 in temporary immersion system (RITA[®]): (a) somatic embryos in torpedo phase (white arrow) and cotyledonal (black arrow) used to inoculate the RITA[®], (b) somatic embryos with normal germination (c) stem, (d) root, (e) germination of somatic embryos in RITA[®] and (f) in the semi-solid culture medium.

y la diferencia del contenido de sacarosa y sales minerales entre el inicio y final del experimento. Estos últimos parámetros se determinaron como medidas indirecta para estimar consumo de sacarosa (Adelberg, 2005; Adelberg y Toler, 2004) y sales minerales por los embriones somáticos en la fase de germinación. El contenido de sacarosa se midió en términos de porcentaje de sacarosa por cada 100 mL de medio de cultivo o grados °Brix (°Bx), para lo cual se tomó una muestra de 20 μL de medio de cultivo al inicio y final del experimento y se midió en un refractómetro digital (Reichert modelo Arias 500). El contenido sales minerales en el medio de cultivo se midió con un potenciómetro (OAKTON, modelo pH/CON 510 series) como conductividad eléctrica en $\mu\text{Siemens.m}^{-1}$ ($\mu\text{S.m}^{-1}$) al inicio y final del experimento. El pH se midió directamente en el medio de cultivo con un potenciómetro.

Efecto de la densidad inicial del inoculo de embriones somáticos de guayabo sobre la germinación en sistemas de inmersión temporal: Se estudió el efecto de dos densidades de inoculo: 250 y 500 mg de embriones somáticos blancos brillante en etapa torpedo y cotiledonal. Por cada densidad estudiada se utilizaron cuatro RITA®. El tiempo y frecuencia de inmersión de 1 min cada 12 h. El tiempo de evaluación, así como las variables evaluadas y el medio de cultivo utilizado fueron similares al descrito en el experimento anterior.

Análisis estadístico: El procesamiento de los datos se realizó utilizando el software analítico Statistix®

to estimate the consumption of sucrose (Adelberg, 2005; Adelberg and Toler, 2004) and mineral salts by the somatic embryos in the germination phase. The sucrose content was measured in terms of sucrose percentage per 100 ml of culture medium or Brix degree (°Bx), for which a sample of 20 μl of culture medium was taken at the beginning and at the end of the experiment and was measured in a digital refractometer (Reichert Arias model 500). The mineral salts content in the culture medium was measured with a potentiometer (OAKTON, model pH/WITH 510 series) as electrical conductivity in $\mu\text{Siemens.m}^{-1}$ ($\mu\text{S.m}^{-1}$) at the beginning and at end of the experiment. The pH was measured directly in the culture medium with a potentiometer.

Initial density effect of the inoculum of somatic embryos of guava on the germination in temporary immersion systems: the effect of two inoculum densities was studied: 250-500 mg of bright white somatic embryos in torpedo cotyledonal phase and for every density studied four RITA® were used. The time and immersion frequency was 1 min every 12 h. The time of evaluation, as well as the evaluated variables and the culture medium used were similar to the ones described in the previous experiment.

Statistical analysis: the data processing was performed using the analytical Statistix® software version 8.0 (2003), once checked the normal distribution of the data using the Shapiro-Wilk normality test, the effect significance of the factors under

versión 8.0 (2003), una vez comprobada la distribución normal de los datos, mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, se determinó la significancia de los efectos de los factores de estudio mediante el análisis de la varianza simple (ANOVA) y en aquellos casos donde el efecto del factor de estudio y/o su interacción resultó significativa estadísticamente se realizó la comparación de medias mediante la prueba de Tukey aun nivel de significancia del 5%.

Resultados y discusión

Comparación de la germinación de embriones somáticos en SIT tipo RITA® y en medio semisólido.

Luego de ocho semanas de cultivo al comparar la germinación de embriones somático de *P. guajava* cv. Enana Roja Cubana EEA-1840 en medio semisólido y en RITA®, los análisis estadísticos detectaron diferencias altamente significativas ($P \leq 0,001$) para el número de embriones con desarrollo normal y radicular (cuadro 1). Para ambas variables los mayores valores se obtuvieron cuando se empleó los RITA®.

Los resultados exitosos obtenidos con el empleo RITA® para número de embriones con desarrollo normal, podría explicarse parcialmente debido a que los RITA® son recipientes de cultivo ventilados donde se crea una atmosfera de baja humedad que promueve la maduración y germinación de los embriones somáticos (Lee *et al.*, 1997). Por otro lado en los SIT el contacto de los embriones con el medio de cultivo se reduce a una película delga-

research was determined through the simple variance analysis (ANOVA) and in those cases where the effect of the factor under research and/or its interaction was statistically significant, the Tukey mean comparison test was used at a significance level of 5%.

Results and discussion

Germination comparison of somatic embryos in TIS RITA® type and in semi-solid culture medium.

After eight weeks of cultivation when comparing the germination of somatic embryos of *P. guajava* cv. Red Cuban Dwarf FSS-1840 in semisolid medium and RITA®, the statistical analyses detected highly significant differences ($P \leq 0.001$) for the number of embryos with normal and root development (table 1). The highest values were obtained for both variables when the RITA® was used.

The successful results obtained with the employment of RITA® for the number of embryos with normal development, could be explained partly due to the fact that the RITA® are ventilated containers crop where a low humidity atmosphere is created that promotes maturation and germination of the somatic embryos (Lee *et al.*, 1997). On the other hand in the TIS the contact of the embryos with the culture medium is reduced to a thin film that covers the embryos, which could limit the inhibitory effects of compounds excreted by the somatic embryos that regulate the ontogenesis of the embryo (Gavish *et al.*, 1992; Quiroz *et al.*, 2006). In relation to the

Cuadro 1. Comparación de la germinación de embriones somáticos de *Psidium guajava* L. cv. Enana Roja Cubana EEA-1840, en el sistema de inmersión temporal tipo RITA® y en medio semisólido.

Table 1. Germination comparison of somatic embryos of *Psidium guajava* L. cv. Cuban Red Dwarf FSS-1840, in the immersion system RITA® type and in semisolid medium.

Sistema de cultivo	Número de embriones germinados con desarrollo		
	Normal	Caulinar	Radicular
Control (semisólido)	30,0 ^b	5,0 ns	2,6 ^b
RITA®	89,6 ^a	3,2 ns	54,2 ^a

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente ($P < 0,001$) para la prueba de comparación de medias de Tukey. ns: no significativo.

da que cubre a los embriones, lo que podría limitar los efectos inhibitorios de compuestos excretados por los embriones somáticos que regulan la ontogénesis del embrión (Gavish *et al.*, 1992; Quiroz *et al.*, 2006). En relación al número de embriones con desarrollo radicular, Berthouly y Etienne (2005) y Martre *et al.*, (2001) señalan que esto es una tendencia presente con el empleo de SIT en la regeneración vía embriogénesis somática, lo cual pudiera ser un indicativo de una pobre maduración de los embriones somáticos (Mallón *et al.*, 2012; Tahardi *et al.*, 2003). Otros investigadores (Mhaske *et al.*, 1998) señalan que este comportamiento también pudiera ser el resultado del continuo cultivo de los embriones somáticos en concentraciones relativamente elevadas de sacarosa que ocasionan una germinación precoz.

Se observó que los embriones con desarrollo normal obtenidos en los RITA® y en el medio de cultivo

number of embryos with root development, Berthouly and Etienne (2005) and Martre *et al.*, (2001) indicate that this is a current trend with the use of TIS in the somatic embryogenesis regeneration, which could indicate a poor maturation of somatic embryos (Mallón *et al.*, 2012; Tahardi *et al.*, 2003). Other researchers (Mhaske *et al.*, 1998) indicate that this behavior could also be the result of continuous cultivation of somatic embryos in relatively high concentrations of sucrose that cause an early germination.

It was observed that embryos with normal development obtained in the RITA® and in semi-solid culture medium were morphologically equal (figure 1e and 1f). Also, it was observed the presence of secondary or repetitive embryogenesis in both treatments and this was higher in the semi-solid culture medium (unpublished data), which is related to the continuous replacement of nutrients in the semi-

semisólido fueron morfológicamente iguales (figura 1e y 1f). También se observó la presencia de embriogénesis secundaria o repetitiva en ambos tratamientos y esta fue mayor en el medio semisólido (datos no publicados), lo cual está relacionado con la continua suplencia de nutrientes en el medio de cultivo semisólido que causa aumentos de biomasa y de la diferenciación de embriones secundarios, siendo esto un impedimento para la sincronización de los embriones (Tahardi *et al.*, 2003).

En los RITA[®], la sincronización de la regeneración de los embriones somáticos fue mejorada por la inmersión temporal ya que durante el periodo de emersión se produce en los embriones un estrés causado por la interrupción temporal del suministro de nutrientes y en conjunción con una humedad reducida, contribuye en el aumento de la producción de embriones somáticos de alta calidad, resultando esto en un sincronizado desarrollo de los embriones somáticos (Lee *et al.*, 2001), con una aparente supresión de las embriogénesis secundaria, que también ha sido reportada para *Citrus* (Cabasson *et al.*, 1997), *Hevea brasiliensis* (Etienne *et al.*, 1997) y *Camella sinensis* (Tahardi *et al.*, 2003).

A través de la caracterización visual y por la respuesta morfológica observada, los embriones cultivados en RITA[®], no presentaron ningún rasgo de hiperhidricidad, aspecto también señalado por Barbón *et al.*, (2014) en café. Estos resultados evidencian que los RITA[®] son sistemas adecuados para mejorar la germinación de embriones somáticos, como se ha reportado en

solid medium causing increments of biomass and the differentiation of secondary embryos, being this an impediment to the synchronization of the embryos (Tahardi *et al.*, 2003).

In the RITA[®], the regeneration synchronization of somatic embryos was improved by the temporary immersion since during the emersion period is produced in the embryos a stress caused by the temporary interruption of the nutrient supply and, along to a reduced humidity, it contributes in the production increment of high quality somatic embryos, resulting in a synchronized development of somatic embryos (Lee *et al.*, 2001), with an apparent suppression of the secondary embryogenesis, which has also been reported for *Citrus* (Cabasson *et al.*, 1997), *Hevea brasiliensis* (Étienne *et al.*, 1997) and *Camella sinensis* (Tahardi *et al.*, 2003). Through the visual characterization and by the morphogenic response observed, the embryos cultured in RITA[®], showed no trait of hiper-hydricity, feature that has also been mentioned by Barbón *et al.*, (2014) in coffee. These results show that the RITA[®] systems are suitable to improve germination of somatic embryos as reported in other researches (Barbón *et al.*, 2014; Etienne-Barry *et al.*, 1999; Sankar-Thomas *et al.*, 2008; Tahardi *et al.*, 2003).

Determination of the time and immersion frequency for the germination of somatic embryos in the temporal immersion systems

The statistical analysis detected differences for the interaction of the factors: time and immersion frequency in the variables number of embryos

otras investigaciones (Barbón *et al.*, 2014; Etienne-Barry *et al.*, 1999; Sankar-Thomas *et al.*, 2008; Tahardi *et al.*, 2003;).

Determinación del tiempo y frecuencia de inmersión para la germinación embriones somáticos en sistemas de inmersión temporal.

Los análisis estadísticos detectaron diferencias para la interacción de los factores de estudio tiempo y frecuencia de inmersión en las variables número de embriones con desarrollo normal y radicular (cuadro 2). Con la frecuencia de inmersión cada 12 h, se obtuvo el mayor número de embriones con germinación normal y con desarrollo radicular independientemente de los tiempos de inmersión evaluados (1 y 2 min.).

with normal development and root (table 2). With the immersion frequency every 12 h, the highest number of embryos was obtained with normal germination and root development regardless the immersion times evaluated (1 and 2 min).

The differences found in this experiment in the evaluated variables could be explained due to the fact that the immersion frequency every 12 h provides an adequate humidity reduction in the cultivation container, which could promote the desiccation of the somatic embryos, consequently, their maturation and germination and subsequent growth. The immersion frequency every 8 h could result in an excessive humidity and with this in a reduction in the number somatic embryos germinated, due to the fact

Cuadro 2. Efecto de la interacción de los factores de estudio tiempo y frecuencia de inmersión sobre la germinación de embriones somáticos de *Psidium guajava* L. cv. Enana Roja Cubana EEA-1840 en sistema de inmersión temporal tipo RITA®.

Table 2. Interaction effect of the study factors time and immersion frequency on the germination of somatic embryos of *Psidium guajava* l. cv. Cuban Red Dwarf FSS-1840 in temporary immersion systems RITA® type.

Tiempo (min)	Frecuencia (veces.dia ⁻¹)	Número de embriones germinados con desarrollo		
		Normal	Caulinar	Radicular
1	12	114,0 ^a	32,3 ns	90,3 ^a
2	12	109,3 ^a	11,0 ns	52,0 ^b
1	8	72,0 ^b	23,7 ns	37,7 ^c
2	8	63,0 ^b	17,0 ns	36,7 ^c

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente (P<0,05) para la prueba de comparación de medias de Tukey. ns: no significativo.

Las diferencias encontradas en este experimento en las variables evaluadas pudieran explicarse debido a que con la frecuencia de inmersión cada 12 h se proporciona una adecuada reducción de la humedad en el recipiente de cultivo, lo cual pudiera promover la desecación de los embriones somáticos y en consecuencia su maduración y posterior germinación y crecimiento. La frecuencia de inmersión cada 8 h pudiera resultar en una excesiva humedad y con ello en una reducción en el número embriones somáticos germinados, debido a que bajo condiciones de humedad relativa cercana al 100% se promueve la proliferación de células indiferenciadas y la multiplicación de los embriones somáticos, mientras que humedad relativa entre 78-90% promueven la maduración y germinación de los embriones somáticos (Lee *et al.*, 2001).

Esta tendencia es confirmada al observar los valores de consumo de sacarosa y sales minerales (cuadro 3), donde los análisis estadísticos detectaron diferencias ($P < 0,05$) para la interacción tiempo y frecuencia de inmersión, observándose un mayor consumo de sacarosa y de sales minerales con la frecuencia de inmersión cada 12 h independientemente del tiempo de inmersión, además que con dicha frecuencia los valores de pH del medio de cultivo fueron más cercanos a los valores de mayor disponibilidad de los elementos nutricionales para su absorción (George *et al.*, 2008). Este consumo de sacarosa y de sales minerales pudiera estar relacionado con los procesos de diferenciación durante la germinación de los embriones somáticos.

that under relative humidity conditions close to 100% the proliferation of undifferentiated cells and the multiplication of the somatic embryos are promoted, while relative humidity between 78-90% promote the maturation and germination of the somatic embryos (Lee *et al.* 2001).

This trend is confirmed when observing the values of sucrose consumption and mineral salts (table 3), where the statistical analysis detected differences ($P < 0.05$) for the interaction time and immersion frequency, observing a higher consumption of sucrose and mineral salts with the immersion frequency every 12 h regardless the immersion time, additionally, with this frequency the pH values of the culture medium were closest to the values of greater availability of the nutritional elements for its absorption (George *et al.*, 2008). This sucrose consumption and mineral salts may be related to the differentiation processes during the germination of the somatic embryos.

In this sense, it was reported that on the germination of somatic embryos of *Picea glauca* 25% of the sucrose available in culture medium is consumed and that this source of carbon was used by the somatic embryos for the construction of structural carbohydrates, photosynthetic pigments and lipids (Carrier *et al.*, 1997).

On the other hand, such as in the previous experiment, the number of embryos with only root development would appear to be the result of an early germination due to a poor maturation of the somatic embryos.

Cuadro 3. Efecto de la interacción de los factores de estudio tiempo y frecuencia de inmersión sobre cambios en pH, consumo de sacarosa y sales minerales del medio de cultivo, en la germinación de embriones somáticos de *Psidium guajava* L. cv. Enana Roja Cubana EEA-1840 en el sistema de inmersión temporal tipo RITA®.

Table 3. Interaction effect of the study factors time and immersion frequency on pH changes, sucrose consumption and mineral salts of the culture medium in the germination of somatic embryos of *Psidium guajava* L. cv. Cuban Red Dwarf FSS-1840 in the temporary immersion system RITA® type.

Tiempo (min)	Frecuencia (veces.día ⁻¹)	pH	Consumo de sacarosa (°Bx)	Consumo de sales minerales (µS.m ⁻¹)
1	12	4,4 ^b	1,8 ^a	2242,3 ^a
2	12	5,0 ^a	2,0 ^a	2534,0 ^a
1	8	4,6 ^b	1,6 ^c	2002,0 ^b
2	8	4,6 ^b	1,7 ^{ab}	2007,0 ^b

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

En este sentido, se reportó que en la germinación de embriones somáticos de *Picea glauca* se consumió el 25% de la sacarosa disponible en el medio de cultivo y que esta fuente de carbono fue utilizada por los embriones somáticos para la construcción de carbohidratos estructurales, pigmentos fotosintéticos y lípidos (Carrier *et al.*, 1997).

Por otro lado al igual que en el experimento anterior el número los embriones con solo desarrollo radicular parecieran ser el resultado de una germinación precoz debida a una pobre maduración de los embriones somáticos.

Efecto de la densidad inicial de inoculo de embriones somáticos sobre la germinación en sistemas de inmersión temporal.

Effect of the initial inoculum density of somatic embryos on the germination in temporary immersion systems.

Within five weeks of crop it was observed the presence of somatic embryos germinated in the two treatments. The largest number of embryos with normal and root development were obtained with the density of 500 mg of fresh mass inoculated. In this density none embryos with root development were observed (table 4).

The results revealed that a directly proportional relationship between the inoculum density and the number of normal embryos and stem development was established. The best germination observed in the density of 500 mg of fresh mass of embryos

A las cinco semanas de cultivo se observó la presencia de embriones somáticos germinados en los dos tratamientos evaluados. El mayor número de embriones con desarrollo normal y caulinar se obtuvieron con la densidad de 500 mg de masa fresca inoculada. En esta densidad no se observaron embriones con desarrollo radicular (cuadro 4).

Los resultados revelaron que se estableció una relación directamente proporcional entre la densidad de inoculo y el número embriones normales y con desarrollo caulinar. La mayor germinación observada en la densidad de 500 mg de masa fresca de embriones inoculados, pudiera estar relacionado con una mayor consumo de nutrientes y sacarosa como se observa en el cuadro 5, lo que pudo desencadenar procesos de expansión celular, acumulación de sustancias de reserva y posterior diferenciación de los embriones en etapas avanzadas de desarrollo (González *et al.*, 2014).

inoculated, could be related to an increased intake of nutrients and sucrose as shown in table 5, which could trigger processes of cell expansion, accumulation of reservoir substances and subsequent embryos differentiation in the advanced development phases (González *et al.*, 2014).

In this sense García-Águila *et al.* (2010) mention that the proper selection of the inoculation density should be determined by its effect on the asynchrony reduction during the development of somatic embryogenesis process. On the other hand, the inoculum density determines the volume amount of the culture medium available per explant, in addition to the physical space for their development. Barbón *et al.* (2014), point out that low densities of inoculum, where there is a greater volume of culture medium by embryo, promote stressful germination condition of the embryos. The trend observed in this experiment is similar to that reported in other crops such as

Cuadro 4. Efecto de la densidad inicial de inoculo de embriones somáticos de *Psidium guajava* L. cv. Enana Roja Cubana EEA-1840, sobre la germinación en el sistema de inmersión temporal tipo RITA®.

Table 4. Effect of the initial inoculum density of somatic embryos of *Psidium guajava* L. cv. Cuban Red Dwarf FSS-1840, on the germination in the temporary immersion RITA® type.

Densidad de inoculo	Número de embriones germinados con desarrollo		
	Normal	Caulinar	Radical
250 mg	67,3 ^b	28,3 ^b	2,0 ^a
500 mg	103,3 ^a	87,3 ^a	0,0 ^b

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

Cuadro 5. Efecto de la densidad inicial de inóculo de embriones somáticos sobre pH, el consumo de sacarosa y sales minerales del medio de cultivo, en la germinación de embriones somáticos de *Psidium guajava* L. cv. Enana Roja Cubana EEA-1840, en el sistema de inmersión temporal tipo RITA®.

Table 5. Effect of the initial inoculum density of somatic embryos on the pH, the consumption of sucrose and mineral salts of the culture medium in the germination of somatic embryos of *Psidium guajava* L. cv. Cuban Red Dwarf FSS-1840, in the temporary immersion system RITA® type.

Densidad de inóculo	pH	Consumo de sacarosa (°Bx)	Consumo de sales minerales ($\mu\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$)
250 mg	4,5 ns	0,16 ^b	1057,8 ^b
500 mg	4,4 ns	0,75 ^a	1905,3 ^a

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

En este sentido García-Águila *et al.* (2010) señalan que la selección adecuada de la densidad de inoculación debe determinarse por su efecto sobre la reducción de la asincronía durante el desarrollo del proceso de embriogénesis somática. Por otro lado la densidad de inóculo determina la cantidad de volumen de medio de cultivo disponible por explante, además del espacio físico para su desarrollo. Barbón *et al.* (2014), señalan que bajas densidades de inóculo, donde hay un mayor volumen de medio de cultivo por embrión, promueven condiciones estresantes para la germinación de los embriones. La tendencia observada en este experimento es similar a la reportada en otros cultivos como café (Barbón *et al.*, 2014) y plátanos (García-Águila *et al.*, 2010).

Las ventajas de los SIT parecen ser el resultado de las condiciones físicas creadas en el recipiente de cultivo

coffee (Barbón *et al.*, 2014) and bananas (García-Águila *et al.*, 2010).

The advantages of the TIS appear to be the result of physical conditions created in the culture container such as: increased availability of nutrients and better diffusion of metabolites excreted by the tissues due to the absence of the interference of the gelling agent. In addition, it can be measured more easily and continuously the variations in pH, conductivity, ions, etc., at the time that the culture medium can be replaced by fresh medium with more ease (Celestino *et al.*, 2005; Etienne and Berthouly, 2002). In addition, it has been verified that the fasting-nutrition conditions and low relative humidity imposed during the emersion phase on the TIS have regulation morphogenic effect in the somatic embryogenesis particularly improving the germination of the

como son: mayor disponibilidad de los nutrientes y mejor difusión de los metabolitos excretados por los tejidos debido a la ausencia de la interferencia del gelificante. Adicionalmente, se pueden medir con más facilidad y en forma continua las variaciones en el pH, conductividad, iones, etc., al tiempo que se puede reemplazar el medio de cultivo por medio fresco con más facilidad (Celestino *et al.*, 2005; Etienne y Berthouly, 2002). Además se ha comprobado, las condiciones de ayuno-nutrición y la baja humedad relativa impuestas durante la fase de emersión en los SIT tienen efectos de regulación morfogénica, en la embriogénesis somática particularmente mejorando la germinación de los embriones somáticos (Tahardi *et al.*, 2003).

Los embriones que presentaron una germinación normal se convirtieron en vitroplantas en la fase de aclimatación (datos no publicados) y un estudio de su crecimiento en vivero fue abordado por Vilchez *et al.*, (2015).

Conclusiones

Este es el primer reporte donde se definen los parámetros básicos de los sistemas de inmersión temporal (RITA[®]) para la germinación de embriones somáticos de guayabo. Se determinó que la germinación de embriones somáticos en sistema de inmersión temporal fue superior en comparación con el medio semisólido y que los parámetros de tiempo y frecuencia de inmersión adecuados para la germinación de embriones somáticos fueron cada 12 h y 1 ó 2 min. de inmersión. La densidad del inóculo tuvo

somatic embryos (Tahardi *et al.*, 2003).

The embryos that presented a normal germination became vitroplants during the acclimatization (unpublished data) and a study of their growth in greenhouse conditions was carried out by Vilchez *et al.*, (2015).

Conclusions

This is the first report where the basic parameters of temporary immersion systems (RITA[®]) were defined for the germination of somatic embryos of guava. It was determined that the embryo germination in temporary immersion system was superior compared to the semi-solid medium and that the time and immersion frequency parameters suitable for the germination of somatic embryos were every 12 h and 1 or 2 min. of immersion. The inoculum density had a germination effect on the somatic embryos of guava and with 500 mg of fresh mass the highest germination averages of somatic embryos are obtained.

Acknowledgment

The authors thank the Scientist, Humanistic and Technological Board of Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) by the partly financed provided to the project VAC-CONDES-0442-14. Likewise, the authors thank the Socialist Research Center of Fruit and Beekeeping Development of CORPOZULIA by the support provided for this research.

End of english version

efecto sobre la germinación de embriones somáticos de guayabo y con 500 mg de masa fresca se obtienen el mayor promedio de germinación de embriones somáticos.

Agradecimiento

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) por el cofinanciamiento otorgado a través del Proyecto VAC-CONDES-0442-14. Así mismo, nuestro agradecimiento al Centro Socialista de Investigación y Desarrollo Frutícola y Apícola de CORPOZULIA por el apoyo brindado para realización de esta investigación.

Literatura citada

- Adelberg, J. 2005. Efficiency in thin-film liquid system for *Hosta* micropropagation. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*. 81(3): 359-368.
- Adelberg, J. y J. Toler 2004. Comparison of agar and an agitated, thin-film, liquid system for micropropagation of ornamental elephant ears. *HortScience*. 39(5): 1088-1092.
- Albarran, J., B. Bertrand, M. Lartaud, y H. Etienne 2005. Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 81(1): 27-36.
- Barbón, R., H. Nguyen, A. Capote, M. De Fera, E. Quiala, y A. Pérez. 2014. Efecto de la densidad de inoculación en la germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' en sistemas de inmersión temporal RITA®. *Biotechnología Vegetal*. 14(2): 91-97.
- Berthouly, M. y H. Etienne 2005. Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. pp 165-195. In: Hvoslef-Eide A. K. y W. Preil (Eds.) *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. Springer Netherlands.
- Cabasson, C., D. Dambier, P. Ollitrault y C. Teisson. 1997. Improvement of *Citrus* somatic embryo development by temporary immersion. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*. 50: 33-37.
- Carrier, D. J., J. E. Cunningham, D. C. Taylor y D. I. Dunstan. 1997. Sucrose requirements and lipid utilization during germination of interior spruce (*Picea glauca* Engelmannii complex) somatic embryos. *Plant Cell Reports*. 16(8): 550-554.
- Celestino, C., I. Hernández, E. Carneros, D. López-Vela y M. Toribio. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Investigación agraria: Sistemas y Recursos Forestales*. 14(3): 345-357.
- De Fera Silva, M., E. J. González, R. B. Rodríguez, A. C. Pérez, M. C. Milián y E. Q. Mendoza. 2005. Diferenciación y germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Catimor 9722 obtenidos en agitador orbital. *Biotechnología Vegetal*. 5(2): 95-101.
- Etienne H., M. Lartaud, N. Michaux-Ferriere, M.P. Carron, M. Berthouly y C. Teisson. 1997. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.) using the temporary immersion technique. *In Vitro Cell Development Biology-Plant*. 33: 81-87.
- Etienne, H., y M. Berthouly. 2002. Temporary immersion systems in the plant micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 69: 215-231.
- Etienne-Barry, D., B. Bertrand, N. Vasquez y H. Etienne. 1999. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass produced in a bioreactor and regeneration of plant. *Plant Cell Report*. 199:111-119.

- Faure, O., W. Dewitte, A. Nougarède y H. Van Onckelen. 1998. Precociously germinating somatic embryos of *Vitis vinifera* have lower ABA and IAA levels than their germinating zygotic counterparts. *Physiologia Plantarum*. 102(4):591-595.
- García-Águila, L., R. Gómez-Kosky, Y. Alvarado-Capó, Z. Sarria y M. Reyes. 2010. Efecto de la densidad de inoculación en la formación y morfología de los embriones somáticos de plátano (*Musa* spp. AAAB, cv. híbrido FHIA-21). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 12(2): 240-247.
- Gavish, H., A. Vardi y R. Fluhr. 1992. Suppression of somatic embryogenesis in *Citrus* cell cultures by extracellular proteins. *Planta*. 186: 511-517.
- George, E. F., M. A. Hall y G. J De Klerk. 2008. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. pp. 115-173. En: George E. F., M. A. Hall, y G. J De Klerk. *Plant propagation by tissue culture*. Springer Netherlands.
- Georgiev, V., A. Schumann, A. Pavlov y T. Bley. 2014. Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*. 14(6): 607-621.
- Gómez-Kosky, R. 1998. Embriogénesis somática. pp. 57-79. En: Pérez J. primera edición. Santa Clara, Cuba. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas.
- González, H., L. García-Águila, R. Gómez-Kosky, A. Rodríguez, B. Pérez, E. Rodríguez. 2014. Efecto de la densidad de inoculación en la maduración de embriones somáticos de plátano cv. FHIA-21' (Musa AAAB). *Biotecnología Vegetal*. 14 (2): 73-79.
- Komamine, A, N. Murata y K. Nomura. 2005. Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures morphology, physiology, biochemistry and molecular biology. *In Vitro Cell Development Biology-Plant*. 41:6-10.
- Lee, E.K., D.Y. Cho y W.Y. Soh. 1997. Effect of humidity on somatic embryogenesis in cotyledon explant culture of carrot. *Journal Plant Biology*. 40:89-94.
- Lee, E.K., D.Y. Cho, y W.Y. Soh. 2001. Enhanced production and germination of somatic embryos by temporary starvation in tissue cultures of *Daucus carota*. *Plant Cell Report*. 20:408-415.
- Mallón, R., P. Coveló y A. M. Vieitez. 2012. Improving secondary embryogenesis in *Quercus robur*: application of temporary immersion for mass propagation. *Trees*. 26(3):731-741.
- Martre, P., D. Lacan, D. Just y C. Teisson. 2001. Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 67(1): 25-35.
- Merkle, S., W. Parrott y B. Flinn. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. pp. 155-203. En: Thorpe, T (Ed.), *In vitro Embryogenesis in Plant*.
- Merkle, S.A., A.T. Wiecko, R.J. Sota y H.E. Sommer. 1990. Maturation and conversion of *Liriodendron tulipifera* somatic embryos. *In Vitro Cell Development Biology-Plant*. 25: 1086-1093.
- Mhaske, V.B., K. Chengalrayan y S. Hazra. 1998. Influence of osmotic and abscisic acid on triglyceride accumulation in peanut somatic embryos. *Plant Cell Report*. 17: 742-746.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 15(3): 473-497.
- Niemenak, N., K. Saare-Surminski, C. Rohsius, D. O. Ndoumou y R. Lieberei. 2008. Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. *Plant Cell Reports*. 27(4): 667-676.

- Quijala, E., M. J. Cañal, M. Meijón, R. Rodríguez, M. Chávez y L. Valledor, R. Barbón. 2012. Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 109(2):223-234.
- Quiroz-Figueroa, F. R., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Avalos y V. M. Loyola-Vargas. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 86(3): 285-301.
- Roels, S., S. Noceda, M. Escalona, J. Sandoval, M.J. Canal, R. Rodríguez y P. Debergh. 2006. The effect of headspace renewal in a temporary immersion bioreactor on plantain (*Musa AAB*) shoot proliferation and quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 84:155-163.
- Sánchez, E. C., D. López-Vela, C. Mur, M. T. Iglesias y I. H. Sánchez. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales*. 14(3): 345-357.
- Sankar-Thomas, Y. D., K. Saare-Surminski y R. Lieberei. 2008. Plant regeneration via somatic embryogenesis of *Camptotheca acuminata* in temporary immersion system (TIS). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 95(2): 163-173.
- Santa-Catarina, C., V. Silveira, M. P. Guerra, N. Steiner, A. F. Macedo, E. I. S. Floh y A. L. W. dos Santos. 2012. The use of somatic embryogenesis for mass clonal propagation and biochemical and physiological studies in woody plants. *Current Topics in Plant Biology*. 13: 103-119.
- Shigeta J., K. Sato y M. Mii. 1996. Effects of initial cell density, pH and dissolved oxygen on bioreactor production of carrot somatic embryos. *Plant Science*. 115: 109-114
- Statistix 8. 2003. *Statistix8: Analytical Software User's Manual*. Tallahassee, Florida, U.S.A.
- Steinmacher, D. A., M. P. Guerra, K. Saare-Surminski y R. Lieberei. 2011. A temporary immersion system improves in vitro regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Annals of Botany*. 108(8): 1463-1475.
- Tahardi, J. S., I. Riyadi y W. A. Dodd. 2003. Enhancement of somatic embryo development and plantlet recovery in *Camellia sinensis* by temporary liquid immersion. *Journal Biotechnologi Pertanian*. 8(1): 1-7.
- Vilchez, J., L. Martínez y N. Albany. 2015. Comparación del crecimiento in vivo entre plántulas y vitroplantas de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840. *Interciencia*. 40(4): 270-274.
- Vilchez, J., N. Albany, R. Gómez-Kosky, L. García y D. Agramonte. 2001. Germinación de embriones somáticos de *Psidium guajava* L. cv. Enana Roja Cubana EEA 18-40 en sistemas de inmersión temporal. *Biotecnología Vegetal*. 1(2): 67-69.
- 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 (LUZ)*. 19(4): 284-293.
- Von Arnold, S., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok y L. Filonova. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69(3): 233-249.
- Watt, M. P. 2012. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology*. 11: 14025-14035.