

Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2016, 33: 181-192

Germinación de embriones somáticos de *Psidium guajava* L. en envases de cultivo con ventilación forzada

Germination of somatic embryos of *Psidium guajava* L. in culture containers with forced ventilation

Germinação de embriões somáticos de *Psidium guajava* L. em embalagens de cultivo com ventilação forçada

Jorge Vilchez Perozo^{1*}, Carolina Sánchez Romero², Fernando Pliego Alfaro², Nilca Albany Valero³, Leonardo Martínez Ferrer¹, Ana Casassa Padrón⁴ y Silvia León de Sierralta³

¹Departamento de Botánica, Laboratorio de Fisiología Vegetal “Merylin Marín”, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia (LUZ), AP 15205, Maracaibo, estado Zulia (4005ZU), República Bolivariana de Venezuela. ²Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias Universidad de Málaga, Campus de Teatinos, s/n 29071 Málaga, España. ³Departamento de Química, Facultad de Agronomía, LUZ, AP 15205, Maracaibo, estado Zulia (4005ZU), República Bolivariana de Venezuela. ⁴Departamento Fitosanitario, Facultad de Agronomía, LUZ, AP 15205, Maracaibo, estado Zulia (4005ZU), República Bolivariana de Venezuela.

Resumen

Los envases de cultivo con ventilación forzada promueven una mejor distribución del CO₂ y una reducción de la humedad relativa en el recipiente, con lo que se mejora la germinación de embriones somáticos. Por tal razón, en esta investigación se comparó, mediante un diseño completamente al azar, la germinación de embriones somáticos de guayabo (*Psidium guajava* L.) cv. “Enana Roja Cubana EEA-1840” en envases de cultivo de vidrio (sistema convencional) sin ventilación forzada, con ventilación forzada, y en envases de cultivo con ventilación forzada tipo RITA[®]. Después de ocho semanas de cultivo se evaluó el número de embriones somáticos germinados con desarrollo normal, caulinar y radicular. El mayor número de embriones con desarrollo normal se obtuvo con el uso de RITA[®] y envases de cultivo con ventilación forzada. En estos últimos tam-

Recibido el 20-01-2016 ● Aceptado el 05-05-2016

Autor de correspondencia e-mail: *jvilchezp@fa.luz.edu.ve; c.sanchez@uma.es; ferpliego@uma.es; nalbany@fa.luz.edu.ve; acasassa@fa.luz.edu.ve

bién se obtuvieron los menores valores de embriones con desarrollo caulinar o radicular. Se concluyó que la ventilación forzada favoreció la germinación de los embriones somáticos con desarrollo normal.

Palabras clave: Enana Roja Cubana EEA-1840, embriogénesis somática, *Psidium guajava*, RITA®.

Abstract

The culture containers with forced ventilation promote better distribution of CO₂ and reduction of the relative humidity in the culture vessel thus improving germination of somatic embryos. For this reason, using a completely randomized design the germination of somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.) cv. “Red Dwarf Cuban EEA-1840” was compared in containers of glass culture (conventional system) without forced ventilation, with forced ventilation and culture containers with forced ventilation RITA® type. After eight weeks of culture the number of somatic embryos with normal, cauline and root development were evaluated. The highest number of embryos was obtained with normal development with RITA® and culture containers with forced ventilation. In the latter, the lowest values of cauline and root development were also obtained. It was concluded that forced ventilation favored the germination of somatic embryos with normal development.

Key words: Cuban Red Dwarf EEA-1840, somatic embryogenesis, *Psidium guajava*, RITA®.

Resumo

As embalagens de cultivo com ventilação forçada promovem uma melhor distribuição do CO₂ e uma redução da umidade relativa no recipiente para melhorar a germinação de embriões somáticos. Por isso, nesta investigação a germinação de embriões somáticos de goiabeira (*Psidium guajava* L.) cv. “Enana Roja Cubana EEA-1840” foi comparado em embalagens de cultivo de vidro (sistema convencional) sem ventilação forçada com ventilação forçada e em embalagens de cultivo com ventilação forçada tipo RITA®. Depois de oito semanas de cultivo o número de embriões somáticos germinados com desenvolvimento normal, caulinar e radicular foi avaliado. O maior número de embriões com desenvolvimento normal foi obtido mediante a utilização de RITA® e embalagens de cultivo com ventilação forçada. Nestes últimos também se obtiveram os menores valores de embriões com desenvolvimento caulinar o radicular. Concluiu-se que a ventilação forçada favoreceu a germinação dos embriões somáticos com desenvolvimento normal.

Palavras chave: Enana Roja Cubana EEA-1840, embriogénesis somática, goiabeira, RITA®.

Introducción

La atmósfera de los cultivos *in vitro* es un factor que en los últimos años se ha investigado, dado que gases como el CO₂ y el etileno juegan un papel importante en la morfogénesis de los embriones somáticos (Jiménez, 2005). Las principales características del ambiente gaseoso de los sistemas de micropropagación convencional son una humedad relativa alta y grandes fluctuaciones diurnas en la concentración de CO₂, acumulación de etileno y otras sustancias tóxicas (Kozai y Kubota, 2005). Se sabe que el etileno se acumula en recipientes de cultivo con bajo intercambio gaseoso, lo que se asocia con diversas respuestas fisiológicas; como pobre diferenciación celular y ausencia de embriogénesis somática (Meijer y Brown, 1988; Roustan *et al.*, 1989). Además, la alta humedad en el recipiente de cultivo puede tener algunos efectos deletéreos sobre las vitroplantas. Varios estudios han demostrado que la reducción de la humedad relativa en el recipiente de cultivo mejoró la resistencia de los tejidos a la pérdida de agua (Wardle *et al.*, 1983; Smith *et al.*, 1992), así como la germinación de embriones somáticos y su conversión en plantas (Afreen *et al.*, 2002).

Los recipientes de cultivo con ventilación forzada promueven una mejor distribución del CO₂ y una reducción de la humedad relativa en el recipiente, debido a la descarga continua de aire en el recipiente (Zhao *et al.*, 2012), mejorando la maduración y la germinación de embriones somáticos (Afreen *et al.*, 2002).

Introduction

The atmosphere of *in vitro* cultures is a factor that has been investigated in the last years since gases such as CO₂ y el ethylene have an essential role in the morphogenesis of the somatic embryos (Jiménez, 2005). The main characteristics of the gaseous environment of the conventional micropropagation systems are high relative humidity and important daily fluctuations in the CO₂ concentration, ethyl accumulation and other toxic substances (Kozai and Kubota, 2005). It is known that ethylene accumulates in culture containers with low gaseous interchange, which is related to different physiologic responses such as poor cell differentiation and absence of somatic embryogenesis (Meijer and Brown, 1988; Roustan *et al.*, 1989). Additionally, the high humidity in culture containers might have some deleterious effects on the vitroplants. Some researchers have showed that the reduction of the relative humidity in the culture container improved the resistance of the tissues with the water lost (Wardle *et al.*, 1983; Smith *et al.*, 1992), as well as the germination of somatic embryos and its conversion in plants (Afreen *et al.*, 2002).

The culture containers with forced ventilation promote a better distribution of CO₂ and a reduction of relative humidity in the container, due to a continuous release of air in the container (Zhao *et al.*, 2012), improving the ripening and germination of somatic embryos (Afreen *et al.*, 2002).

En base a lo anteriormente expuesto, se realizó esta investigación con el propósito de evaluar el efecto de la ventilación forzada en el envase de cultivo sobre la germinación de embriones somáticos de guayabo (*Psidium guajava* L.).

Materiales y métodos

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

Se indujo embriogénesis somática en guayabo cv. “Enana Roja Cubana EEA-1840” siguiendo el protocolo descrito por Vilchez *et al.* (2002). Para este estudio se cultivaron embriones cigóticos inmaduros en etapa torpedo y cotiledonar durante ocho semanas en medio de cultivo semisólido Murashige y Skoog (1962; MS), 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 y gelificado con 4 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma-Aldrich®).

Para la fase de proliferación, se utilizó como material inicial callos con estructuras embriogénicas, al que se le eliminaron los embriones somáticos en etapa torpedo y cotiledonar. Este callo embriogénico se cultivó en un medio igual al empleado en la etapa de inducción, pero en estado líquido y en agitación a 90 rpm. Semanalmente, por seis semanas, se renovó el 50% del volumen del medio de cultivo.

Para promover la maduración de los embriones somáticos provenientes

Because of the latter, the main objective of this research was to evaluate the effect of forced ventilation in the culture container on the germination of somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.).

Materials and methods

This research was carried out at the Biotechnology Laboratory “Profa. Silvia León de Sierralta”, Agronomy Faculty, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

The somatic embryogenesis was induced in guava cv. “Red Dwarf Cuban EEA- 1840” following the protocol described by Vilchez *et al.* (2002). For the current research immature zygote embryos were cultivated in torpedo and cotyledon phase for eight weeks in a semi-solid culture medium Murashige and Skoog (1962; MS), supplemented with 1 mg.L⁻¹ of acid 2,4 dichlorophenoxyacetic, 400 mg.L⁻¹ of L-glutamine, 150 mg.L⁻¹ of ascorbic acid, 6 g.L⁻¹ of sucrose and gelled with 4 g.L⁻¹ of Phytigel (Sigma-Aldrich®).

For the proliferation phase, the callus was used as initial material with embryogenic structure, eliminating the somatic embryos in the torpedo and cotyledon phase. This embryogenic callus was cultivated in a medium equal to the one used in the induction phase but in liquid phase and agitating it at 90 rpm. Fifty percent of the volume of the culture medium was renewed weekly for six weeks.

To promote the maturation of somatic embryos coming from the proliferation phase, these germinated for four weeks in RITA® systems

de la fase de proliferación, estos se cultivaron durante cuatro semanas en sistemas RITA® (recipiente de inmersión temporal automatizado, CIRAD-Francia, Francia), con un tiempo y frecuencia de inmersión de 1 min cada 8 h. En la fase de maduración se emplearon como inóculo 500 mg de embriones somáticos en etapa torpedo por RITA®. El medio de cultivo utilizado en esta fase fue el MS a la mitad de la concentración de los macroelementos y 30 g.L⁻¹ de sacarosa. Las características y el funcionamiento de los RITA® utilizados en las fases de maduración y germinación fueron los descritos por Etienne y Berthouly (2002), Martre *et al.* (2001) y Georgiev *et al.* (2014).

Para comparar el efecto de la ventilación forzada sobre la germinación de embriones somáticos de guayabo, se evaluaron dos tipos de envases con ventilación forzada: sistemas de inmersión temporal tipo RITA® (figura 1a) y envases de cultivo de vidrio de 500 mL de capacidad con ventilación forzada (ECCVF, figura 1b). Como testigo se utilizaron envases de vidrio de 500 mL de capacidad sin ventilación forzada o sistema convencional (ECSVF, figura 1c). Los ECCVF se construyeron realizando orificios de entrada y salida de aire en la tapa, donde se conectaron filtros de membrana teflón de 0,20 µm, mediante mangueras de silicón. El tiempo y frecuencia de la ventilación forzada fue de 1 min dos veces al día, respectivamente. Iguales parámetros fueron utilizados para los RITA®. A los ECCVF y ECSVF se les adicionaron 50 mL de medio de cultivo gelificado con 6 g.L⁻¹ de agar gel (Sigma-Aldrich®), mientras que a los RITA® se les añadió 200 mL de medio de cultivo líquido. El

(automated temporal immersion container, CIRAD-France, France) with a time and immersion time of 1 min every 8 h. In the maturation phase were used as inoculum 500 mg of somatic embryos in torpedo phase with RITA®. The culture medium used in this phase was MS with half of the concentration of the macro-elements and 30 g.L⁻¹ of sucrose. The characteristics and functioning of the RITA® used in the phases of maturation and germination are those described by Etienne and Berthouly (2002), Martre *et al.* (2001) and Georgiev *et al.* (2014).

To compare the effect of the forced ventilation on the germination of somatic embryos of guava, two types of containers with forced ventilation were evaluated: temporal immersion systems RITA® type (figure 1a) and glass container culture of 500 mL of capacity with forced ventilation (CCCFV, figure 1b). As witness, glass containers of 500 mL of capacity were used without forced ventilation or conventional system (CCWFV, figure 1c).

The CCCFV were created doing input and output holes of air in the lid, where filters of 0.20 µm teflon membrane were connected through silicon hoses. The time and frequency of forced ventilation was of 1 min twice a day, respectively. The same parameters were used for RITA®. Fifty mL of the gelled culture medium with 6 g.L⁻¹ of agar gel (Sigma-Aldrich®) were added to CCCFV and CCWFV; meanwhile, 200 mL of the liquid culture medium were added to the RITA®. The medium employed for the germination was MS, supplemented with 0.25 mg.L⁻¹ of N⁶-benzylaminopurine and

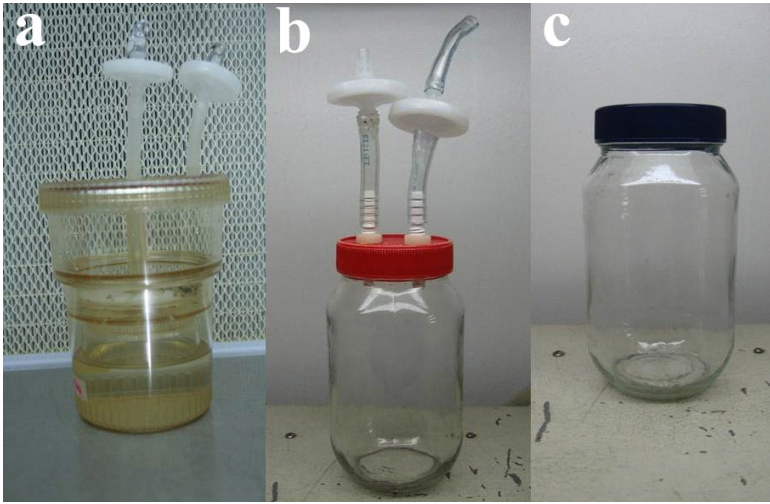


Figura 1. Envases de cultivo utilizados para la germinación de embriones somáticos de *Psidium guajava* L. cv. “Enana Roja Cubana EEA-1840”: a) recipiente de inmersión temporal automatizado (RITA®); b) envase de cultivo con ventilación forzada (ECCVF); c) envase de cultivo sin ventilación forzada (ECSVF) o sistema convencional.

Figure 1. Culture containers used for the germination of somatic embryos of *Psidium guajava* L. cv. “Red Dwarf Cuban EEA-1840”: a) container of automated temporal immersion (RITA®; b) culture container with forced ventilation (CCCFV); c) culture container without forced ventilation (CCWFV) or conventional system.

medio empleado para la germinación fue MS, suplementado con 0,25 mg.L⁻¹ de N⁶-bencilaminopurina y 0,01 mg.L⁻¹ de DI-31 (análogo de brasinoesteroide).

Los tratamientos se dispusieron en un diseño completamente aleatorizado, con cuatro repeticiones (envases de cultivo) y en cada repetición se inocularon 500 mg de embriones somáticos blancos y brillantes en etapas de torpedo y cotiledonar, provenientes de la fase de maduración. Después de ocho semanas de cultivo se evaluó el número de embriones somáticos con desarrollo normal (em-

0.01 mg.L⁻¹ of DI-31 (analogue of brassinosteroids).

The treatments were organized in a completely randomized design with four replications (glass containers) and on each replication were inoculated 500 mg of white and bright somatic embryos in torpedo and cotyledon phases coming from maturation phase. After eight weeks of cultivation, the number of somatic embryos was evaluated with normal development (embryos that presented development of the cauline axis and root axis), cauline (embryos with development on the cauline axis and

briones que presentaron desarrollo del eje caular y del eje radicular), caular (embriones con desarrollo únicamente del eje caular y hojas cotiledonares) y radicular (embriones que solo presentaron desarrollo del eje radicular). Durante el periodo de cultivo, no se realizaron cambios de medio de cultivo.

Los cultivos *in vitro* se mantuvieron en cámara de cultivo, bajo luz blanca fluorescente continua, con una radiación fotosintéticamente activa de $200 \mu\text{mol}^{-1}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, temperatura de $26\pm 1^\circ\text{C}$ y humedad relativa promedio de 46%.

Para determinar la significancia de los efectos de los factores de estudio se empleó el análisis de la varianza simple (ANADEVA) y cuando se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($P\leq 0,05$), se realizó la comparación de medias usando la prueba de Tukey. El procesamiento de los datos se realizó utilizando el software analítico Statistix®, versión 8.0 (Analytical Software, Tallahassee, Florida, EEUU).

Resultados y discusión

El ANADEVA detectó diferencias estadísticamente significativas ($P\leq 0,05$) entre los diferentes sistemas de ventilación forzada probados. Los valores más elevados de germinación normal se obtuvieron en los RITA® y en los ECCVF (103,3 y 98,8, respectivamente), sin diferencias significativas entre ellos (cuadro 1).

Las características intrínsecas de los envases de ventilación forzada pudieran explicar los resultados obtenidos en los RITA® y en los ECCVF,

cotyledon leaves) and root (embryos with development on the root axis). During the culture period, none changes of the culture medium were done.

In vitro cultures kept in culture chamber under continuous fluorescent white light with active photosynthetic radiation of $200 \mu\text{mol}^{-1}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, temperature of $26\pm 1^\circ\text{C}$ average relative humidity of 46%.

The simple variance analysis (ANOVA) was employed to determine the significance of the effects of the factors under research, and Tukey test was used ($P\leq 0.05$) when statistical significant differences were detected. The data processing was done using the analytical software Statistix®, version 8.0 (Analytical Software, Tallahassee, Florida, EEUU).

Results and discussion

The analysis of variance (ANOVA) detected significant statistical differences ($P\leq 0.05$) among the different tested forced ventilation systems. The highest values of normal germination were obtained in the RITA® and in the CCCFV (103.3 and 98.8, respectively) without significant differences in between (table 1).

The intrinsic characteristics of the forced ventilation containers might explain the results obtained in the RITA® and in the CCCFV, that is, the periodic renewal of the atmosphere that provided a reduction of the humidity in the culture container equilibrating it to the RH of the culture chamber, which might promote the germination (Lee *et al.*, 2001). On the contrary, in the witness treatment (CCWFV) was observed an excessive humidity and

Cuadro 1. Germinación de embriones somáticos de *Psidium guajava* L. cv. “Enana Roja Cubana EEA-1840” en recipientes de inmersión temporal automatizados (RITA®), en envases de cultivo con ventilación forzada (ECCVF) y en envases sin ventilación forzada (ECSVF).

Table 1. Germination of somatic embryos of *Psidium guajava* L. cv. “Red Dwarf Cuban EEA-1840” in containers of automated temporal immersion (RITA®) in culture containers with forced ventilation (CCCFV) and in containers without forced ventilation (CCWFV).

Sistema de cultivo	Número de embriones germinados con desarrollo:		
	Normal	Caulinar	Radicular
ECSVF	30,0 ^b	11,80 ^a	2,60 ^a
RITA®	103,3 ^a	10,33 ^a	2,00 ^a
ECCVF	98,8 ^a	5,20 ^b	0,00 ^b

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

esto es, la renovación periódica de la atmósfera que proporcionó una reducción de la humedad en el recipiente de cultivo equilibrándola con la HR de la cámara de cultivo, lo cual pudiera promover la germinación (Lee *et al.*, 2001). Por el contrario, en el tratamiento testigo (ECSVF) se produjo una excesiva humedad y con ello una reducción en el número de embriones germinados, debido a que bajo condiciones de humedades relativas cercanas al 100%, se promovió la proliferación de células indiferenciadas y la multiplicación de los embriones somáticos (Lee *et al.*, 2001). Estos resultados estuvieron de acuerdo con los reportados por Afreen *et al.* (2002) en *Coffea arabusta*, quienes evaluaron el uso de RITA® modificados para mejorar el intercambio gaseoso, mediante el empleo de ventilación forzada extra, encon-

consequently a reduction in the number of germinated embryos, since under relative humidity conditions close to 100% was promoted the proliferation of undifferentiated cells and the multiplication of somatic embryos (Lee *et al.*, 2001). These results agreed to those reported by Afreen *et al.* (2002) in *Coffea arabusta*, who evaluated the use of RITA® modified to improve the gaseous interchange employing extra forced ventilation, and finding that with this type of system the conversion of somatic embryos in cotyledon phase in seedlings favored.

Even though the number of embryos with normal germination did not present significant statistical differences when using CCCFV or RITA®, in the last the quantity was higher, which might be that in the RITA® there was a higher proportion

trando que con este tipo de sistema, se favoreció la conversión de embriones somáticos en estado cotiledonar en plántulas.

Aunque el número de embriones con germinación normal no presentó diferencias estadísticamente significativas cuando se utilizó ECCVF o RITA[®], en los últimos la cantidad fue mayor, lo cual pudiera deberse a que en los RITA[®] hubo una mayor proporción de medio de cultivo por explante y a que en los ECCVF la difusión de los nutrientes entre el medio de cultivo y los embriones fue baja, mientras que en los RITA[®] los nutrientes podrían ser absorbidos más rápidamente, ya que el contacto intermitente del medio de cultivo con la mayor parte o la superficie completa de los embriones somáticos, mejoró la difusión de nutrientes entre los explantes y el medio (Watt, 2012). Además, estas condiciones limitaron los efectos adversos de los compuestos excretados por los embriones somáticos (Gavish *et al.*, 1992; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006).

Por otra parte, el menor número de embriones somáticos con germinación normal en los ECSVF, podría estar relacionado con una distribución poco uniforme del CO₂ y la humedad relativa en el recipiente de cultivo. En este sentido, Afreen *et al.* (2002) reportaron que en recipientes de cultivo sin ventilación forzada, los niveles de CO₂ disminuyeron linealmente con el aumento de la distancia desde la base hacia la tapa. Además, la ventilación forzada promovió el crecimiento de los explantes, ya que redujo la resistencia a la difusión del CO₂ entre la

of the culture medium by explants and that in the CCCFV the diffusion of the nutrients among the culture medium and the embryos was low; meanwhile, in the RITA[®] the nutrients might have been absorbed more rapidly, since the intermittent contact of the culture medium with the highest part of the surface complete by the somatic embryos improved the diffusion of the nutrients among the explants and the medium (Watt, 2012). Additionally, these conditions limited the adverse effects of the compounds excreted by the somatic embryos (Gavish *et al.*, 1992; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006).

On the other hand, the lowest number of somatic embryos with normal germination in the CCWFV might be related to a little distribution of the CO₂ and the relative humidity in the culture container. In this sense, Afreen *et al.* (2002) reported that in culture containers with forced ventilation, the CO₂ levels reduced lineally with the increment of the distance from the base to the lid. Also, the forced ventilation promoted the growth of the explants since it reduced the resistance to the diffusion of the CO₂ from the surface of the leaf and the environment of the culture container (Heo *et al.*, 2001).

Using the CCCFV was obtained a lower number of embryos with cauline and root development. The presence of abnormal embryos has been reported in the somatic embryogenesis of different cultures such as *Arachis hypogaea* (Chengalrayan *et al.*, 1994; 1997), *Eucalyptus globulus* (Pinto *et al.*, 2002), *Musa* spp. AAAB cv. hybrid FHIA-21 (García-Águila *et al.*, 2010)

superficie de la hoja y el ambiente del envase de cultivo (Heo *et al.*, 2001).

Con el empleo de ECCVF se obtuvo un menor número de embriones con desarrollo caulinar o radicular. La presencia de embriones anormales se ha reportado en la embriogénesis somática de varios cultivos como *Arachis hypogaea* (Chengalrayan *et al.*, 1994; 1997), *Eucalyptus globulus* (Pinto *et al.*, 2002), *Musa* spp. AAAB cv. híbrido FHIA-21 (García-Águila *et al.*, 2010) y *C. arabica* (Barbón *et al.*, 2014) entre otros; así mismo, se ha asociado a los sistemas de inmersión temporal (Berthouly y Etienne, 2005). Sin embargo, en los ECCVF, el bajo número de embriones con desarrollo caulinar o radicular podría estar relacionado con una mayor hidrólisis de sustancias de reserva, debido a una menor humedad en el recipiente de cultivo (Corder y Henry, 1989; Lee *et al.*, 1997).

Conclusiones

La ventilación forzada en los recipientes de cultivo, favoreció la germinación de embriones somáticos de guayabo (*P. guajava*), en comparación con los sistemas de control sin ventilación forzada.

Literatura citada

- Afreen, F., S. Zobayed and T. Kozai. 2002. Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: development of a bioreactor for large scale plantlet conversion from cotyledonary embryos. *Annals of Botany* 90(1):21-29.
- Barbón, R., H. Nguyen, A. Capote, M. De Feria, E. Quiala E. y A. Pérez. 2014. Efecto de la densidad de inoculación and *C. arabica* (Barbón *et al.*, 2014) among others; likewise, it has been associated to the temporal immersion systems (Berthouly and Etienne, 2005). However, in the CCCFV, the low number of embryos with cauline and root development might be related to a higher hydrolysis of reservoir substances due to a lower humidity in the culture container (Corder and Henry, 1989; Lee *et al.*, 1997).
- Conclusions**
- The forced ventilation in the culture containers favored the germination of somatic embryos of guava (*P. guajava*), compared to the control systems without forced ventilation.
-
- End of english version*
-
- en la germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' en sistemas de inmersión temporal RITA®. *Biotecnología Vegetal* 14(2):91-97.
- Berthouly, M. and H. Etienne. 2005. Temporary immersion system: A new concept for use liquid medium in mass propagation. p. 165-195. *In*: Hvoslef-Eide A.K. and W. Preil (Eds.). *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. Springer Netherlands.
- Chengalrayan, K., S. Sathaye and S. Hazra. 1994. Somatic embryogenesis from mature embryo-derived leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Reports* 13(10):578-581.
- Chengalrayan, V., B. Mhaske and S. Hazra. 1997. High-frequency conversion of abnormal peanut somatic embryos. *Plant Cell Reports* 16:783-786.

- Corder, A.M. and R.J. Henry. 1989. Carbohydrate-degrading enzymes in germinating wheat. *Cereal Chemistry* 66(5):435.
- Etienne, H. and M. Berthouly. 2002. Temporary immersion systems in the plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69:215-231.
- García-Águila L., R. Gómez-Kosky, Y. Alvarado-Capó, Z. Sarría 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 and R. Fluhr. 1992. Suppression of somatic embryogenesis in *Citrus* cell cultures by extracellular proteins. *Planta* 186:511-517.
- Georgiev, V., A. Schumann, A. Pavlov and T. Bley. 2014. Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences* 14(6):607-621.
- Heo, J., S.B. Wilson and T. Kozai. 2001. A forced ventilation micropropagation system for photoautotrophic production of sweet potato plug plantlets in a scaled-up culture vessel: I. Growth and uniformity. *HortTechnology* 11(1):90-94.
- Jiménez, V.M. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation* 47(2-3):91-110.
- Kozai, T. and C. Kubota. 2005. Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages. p. 19-30. *In: Kozai, T., F. Afreen and M.A. Zobayed* (Eds.). *Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system*. First edition. Springer, Dordrecht Netherlands.
- Lee, E.K., D.Y. Cho and W.Y. Soh. 1997. Embryogenesis in cotyledon explant culture of carrot. *Journal of Plant Biology* 40(2):89-94.
- Lee, E.K., D.Y. Cho and W.Y. Soh. 2001. Enhanced production and germination of somatic embryos by temporary starvation in tissue cultures of *Daucus carota*. *Plant Cell Reports* 20:408-415.
- Martre, P., D. Lacan, D. Just and C. Teisson. 2001. Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67(1):25-35.
- Meijer, E.G. and D.C. Brown. 1988. Inhibition of somatic embryogenesis in tissue culture of *Medicago sativa* by aminoethoxyvinylglycine, aminoxyacetic acid, 2,4-dinitrophenol and salicylic acid at concentrations which do not inhibit ethylene biosynthesis and growth. *Journal of Experimental Botany* 39:263-270.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3):473-497.
- Pinto, G., C. Santos, L. Neves and C. Araujo. 2002. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Cell Reports* 21(3):208-213.
- Quiroz-Figueroa, F.R., R. Rojas-Herrera, R.M. Galaz-Avalos and 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.
- Roustan, J. P., A. Latche and J. Fallot. 1989. Stimulation of *Daucus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis: cobalt and nickel. *Plant Cell Reports* 8:182-185.
- Smith, E.F., I. Gribaudo, A.V. Roberts and J. Mottley. 1992. Paclobutrazol and reduced humidity improve resistance to wilting of micropropagated grapevine. *HortScience* 27(2):111-113.

- Statistix 8. 2003. Statistix8: Analytical Software User's Manual. Tallahassee, Florida, U.S.A.
- 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.
- Wardle, K., E.B. Dobbs, and K.C. Short. 1983. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. Journal of the American Society for Horticultural Science 108:386-389.
- Watt, M.P. 2012. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. African Journal of Biotechnology 11:14025-14035.
- Zhao, Y., W. Sun, Y. Wang, P.K. Saxena and C.Z. Liu. 2012. Improved mass multiplication of *Rhodiola lacrenulata* shoots using temporary immersion bioreactor with forced ventilation. Applied Biochemistry and Biotechnology 166(6):1480-1490.