

EFECTO DE TRES ANTIOXIDANTES EN EL CULTIVO *In Vitro* DE ÁPICES DE GUAYABA (*Psidium guajava* L.). RELACIÓN ENTRE EL ORIGEN DEL EXPLANTE Y EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS

O. Concepción[✉], Lelurllys Nápoles, Aurora T. Pérez, Martha Hernández, Ninel Peralta y R. Trujillo

ABSTRACT. The effect of three antioxidant agents in the *in vitro* culture of guava (*Psidium guajava* L.) var. Enana Roja Cubana EEA 18-40, as well as the relation among the topophysical origin of explants in the tree, the content of phenolic compounds in vegetable tissues and the success of *in vitro* culture of guava are reported here. The lowest levels of phenolization were observed with the use of the PVPP (0.5 %), which caused a lower excretion of phenolic compounds to the culture medium although it showed the highest values of contamination when it was compared with the L-cysteine and the citric acid + ascorbic acid mixture, in which phenolization was extremely high although contamination levels were not frequent. On the other hand, it was demonstrated that the highest phenolic compound content was recorded in the apical buds from the tree crown, which reached 229.32 mg.g⁻¹ fresh mass, and differed significantly from the rest of types of explants. The explants obtained from root sprouts (basal origin) showed the lowest phenolic compound contents and had the greatest efficiency at *in vitro* establishment. Therefore, these root sprouts were the most appropriate explants recommended to surpass the barrier of phenolization during the initial stages of *in vitro* guava culture.

Key words: *in vitro* culture, guava, phenolic compounds, juvenility of plants

RESUMEN: En este trabajo se estudia el efecto de tres agentes antioxidantes en el control de la fenolización para el cultivo *in vitro* de la guayaba (*Psidium guajava* L.) var. Enana Roja Cubana EEA 18-40, así como la relación que existe entre el origen de los explantes en el árbol, el contenido de compuestos fenólicos en las yemas y el éxito del establecimiento *in vitro* de la yema. Los niveles más bajos de fenolización se obtienen con el uso del PVPP (0.5 %), el cual propició una menor exudación de compuestos fenólicos al medio de cultivo a pesar de mostrar los valores de contaminación más altos cuando se comparó con la L-cisteína (25 mg.L⁻¹) y la mezcla de ácido ascórbico (150 mg.L⁻¹) + ácido cítrico (200 mg.L⁻¹), en los que la fenolización es extremadamente alta a pesar de tener niveles de contaminación en baja frecuencia. Por otro lado, se demostró que el mayor contenido de compuestos fenólicos lo tienen las yemas provenientes de brotes de la copa del árbol, el cual asciende a 229.32 mg.g⁻¹ de masa fresca de tejido vegetal y difiere significativamente del resto de los tipos de explantes. Por su parte, los explantes obtenidos a partir de rebrotes de la raíz (origen basal) manifiestan los contenidos más bajos de compuestos fenólicos, y poseen la mayor eficiencia en el establecimiento *in vitro*. Por tanto, estos se recomiendan como el material vegetativo más apropiado para superar la barrera de la fenolización durante los estadios iniciales del cultivo *in vitro* en la guayaba.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, guayaba, compuestos fenólicos, estado juvenil de las plantas

INTRODUCCIÓN

La guayaba se considera una de las más valiosas frutas tropicales, entre otras cosas por su elevado conte-

nido de vitamina C, que en ocasiones sobrepasa los 400 mg en 100 g de pulpa. Esto puede estar asociado al cultivar, al grado de madurez del fruto y a la época del año. Además, posee abundantes fibras, vitamina A, pectina, fósforo, calcio y potasio (1).

El cultivo de la guayaba (*Psidium guajava* L.) despierta gran interés en muchos países y su futuro es alentador. Se cultiva en África, la India, Hawai, Brasil, Puerto Rico, Estados Unidos y, en Cuba, desde 1960 se incrementa su cultivo en grandes proporciones (1).

La propagación convencional de esta especie se lleva a cabo mediante el uso de estacas; sin embargo, este es un proceso de baja eficiencia, debido a que una alta

O. Concepción, Investigador Agregado; Lelurllys Nápoles, Especialista del Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos; Aurora T. Pérez y Ninel Peralta, Reserva Científica; Dra.C. Martha Hernández, Investigador Auxiliar y Dr.C. R. Trujillo, Investigador Auxiliar y Profesor Titular del Laboratorio de Ingeniería Metabólica, Centro de Bioplantas, carretera a Morón km 9, CP 69450, Ciego de Ávila, Cuba

Abreviaturas: PVPP= Polivinilpolipirrolidona, AIA=ácido Indol-3-acético, BAP= 6-bencilaminopurina

✉ oconcepcion@bioplantas.cu

fenolización impide el buen enraizamiento. Por otro lado la existencia limitada de plantas donadoras en algunos cultivos obstaculiza este proceso. El injerto es afectado severamente por la contaminación ambiental, por lo que se emplea con poco éxito para producir grandes cantidades de plantas. La semilla constituye otro método de propagación convencional; sin embargo, se reconoce que produce hasta un 30 % de variabilidad.

La biotecnología en sentido general y el cultivo *in vitro* en particular pueden ayudar a resolver estos problemas en esta especie. Se debe tener en cuenta que la multiplicación *in vitro* constituye una alternativa viable para la propagación masiva de progenies sanas, uniformes genéticamente y con caracteres morfológicos juveniles recuperados.

La guayaba, como muchas otras plantas, se ha propagado con el empleo de las técnicas de cultivo *in vitro* (2, 3, 4), las cuales han mostrado resultados ventajosos en la producción rápida de variedades de importancia económica. Se ha establecido un protocolo de propagación por cultivo de tejidos en esta especie que utiliza como material de partida brotes obtenidos a partir de semillas germinadas *in vitro* (5). Este protocolo aunque suple algunas necesidades de material no constituye una herramienta completa, pues a partir de semillas lleva implícita la variabilidad genética propia de la reproducción sexual en esta especie.

Sobre la propagación *in vitro* a partir de yemas, se considera que existen dos problemas cruciales para lograr éxito en este cultivo: el primero es la contaminación y el segundo la fenolización u oscurecimiento de los tejidos, especialmente cuando se parte de material colectado directamente del campo (3).

Se asegura que la fenolización está relacionada con el estado fisiológico de los tejidos o explante (6), o sea, que la edad ontogenética está vinculada a la presencia y acumulación de compuestos fenólicos en el vegetal. Por otro lado, la selección de material vegetal adecuado (tejidos con características fisiológicas juveniles apropiadas) dentro del cuerpo de un árbol maduro puede ser un factor limitado en plantas que como la guayaba tienen una alta frecuencia de fenolización durante los primeros estadios del cultivo *in vitro*.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, con el presente trabajo se persigue comparar el efecto de diferentes agentes antioxidantes en el control de la fenolización para el cultivo *in vitro* de la guayaba, así como estudiar la relación que existe entre el origen topofísico, contenido de fenoles y establecimiento *in vitro* de las yemas de guayaba.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó con brotes tomados a partir de plantas adultas de guayaba de la variedad Enana Roja Cubana EEA 18-40 plantadas en un suelo Ferralítico Rojo, con un marco de siembra de 4.0 x 1.5 m, en áreas de la Estación Experimental de la Universidad de Ciego de Avila.

Uso de diferentes agentes antioxidantes para controlar la fenolización

Colecta del material vegetal. Se utilizaron brotes de aproximadamente 5-6 cm de longitud con tres pares de hojas visibles, provenientes de la copa de árboles de guayaba seleccionados en el campo, los cuales una vez separados de la planta donadora se colocaron en diferentes frascos que contenían 500 mL de una disolución estéril de antioxidantes. Se utilizó: 1) L-cisteína a $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 2) PVPP a $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y 3) una mezcla de ácido ascórbico ($150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) + ácido cítrico ($200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), teniendo en cuenta que son los antioxidantes y las concentraciones más empleadas en este cultivo (20).

Desinfección e implantación *in vitro*. En el laboratorio los brotes se lavaron con abundante agua corriente y detergente. Luego en el flujo laminar se realizó la desinfección superficial con bicloruro de mercurio al 0.05 % durante 20 minutos, después de los cuales se enjuagaron con abundante agua destilada estéril. Al finalizar cada uno se colocó nuevamente en sus respectivas soluciones estériles antioxidantes y luego se aisló la yema apical para su implantación.

La inoculación de las yemas apicales se realizó en tubos de ensayo que contenían 10 mL de medio de cultivo de establecimiento constituido por las sales MS (7) suplementado con BAP ($4.44 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), AIA ($8.56 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) y el respectivo antioxidante añadido a igual concentración que en la disolución de colecta, excepto para el PVPP, el cual se utilizó a $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Los cultivos se incubaron en la cámara de luz artificial a temperatura de $26\pm 1^\circ\text{C}$ e intensidad de luz de $35.7 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ con fotoperíodo de 16 horas luz. Se implantaron un total de 30 yemas por tratamiento.

Las evaluaciones se realizaron a las 72 horas de iniciado el cultivo y se analizó el porcentaje de contaminación y supervivencia de las yemas. Para evaluar el nivel de fenolización, se utilizó la siguiente escala cualitativa: poco fenolizado (cuando el 10-40 % del volumen del explante presentó señales de fenolización aisladas), medianamente fenolizado (para explantes con el 40-70 % del volumen fenolizado y presencia de un halo de color parduzco en el medio alrededor del explante) y muy fenolizado (para aquellos explantes donde el 100 % de su volumen se encontraba fenolizado o necrosado y además se observó un halo de color negruzco muy intenso en el medio). Este método de evaluación fue adaptado a las yemas, tomando como base el propuesto para evaluar segmentos de hojas de guayaba cultivados *in vitro* (8). Con esta escala se calculó el porcentaje de explantes pertenecientes a cada categoría en cada uno de los tratamientos.

Análisis del contenido de fenoles en yemas de diferentes partes del árbol de guayaba y su relación con el establecimiento *in vitro*

Colecta del explante. Se colectaron aproximadamente 50 brotes con tres pares de hojas visibles de diferente

origen topofísico en árboles adultos de guayaba cultivados en el campo:

- ✦ de la raíz (brotes muy juveniles comúnmente llamados "ladrones")
- ✦ de la primera rama del tronco (brotes juveniles y muy vigorosos que surgen directamente del leño)
- ✦ de la copa (brotes juveniles ubicados en el extremo de ramas en producción).

A cada brote agrupado según la clasificación anterior se le aisló la yema apical que se seccionó en tres partes iguales, las que se colocaron inmediatamente después de separadas en nitrógeno líquido, en agua destilada estéril y en una disolución de PVPP al 0.5 % (M/V). Otros brotes agrupados según la clasificación anterior pero sin dividir se colocaron en la disolución de PVPP al 0.5 % (M/V), con vistas a realizar el establecimiento *in vitro*.

Extracción de los fenoles. En el laboratorio se realizó la extracción con 10 volúmenes de metanol (9). La muestra se homogenizó y la suspensión se centrifugó a 27200g durante 15 minutos. El sobrenadante se colectó para determinar el contenido de fenoles solubles. El *pellet* se disolvió en NaOH 2M (2½ volúmenes) y se neutralizó con HCL 2M (a igual volumen). Luego este se utilizó para determinar el contenido de fenoles ligados a las paredes celulares.

La concentración de fenoles se determinó mediante una curva de calibración estándar del ácido clorogénico a la concentración de 0.05 mol.L⁻¹. La densidad óptica se midió a los 725 nm. El resultado permitió calcular el contenido de fenoles totales en dependencia de la posición del explante en el árbol.

Establecimiento *in vitro*. Cada tipo de brote se lavó con agua corriente y detergente antiséptico 3 % (v/v) Halogen Especial durante 15 minutos. Las hojas abiertas se retiraron y se sumergieron nuevamente en la disolución de PVPP al 0.5 % para prevenir la oxidación fenólica. La esterilización superficial por agitación durante 20 minutos se realizó con una disolución de bicloruro de mercurio al 0.05 % (M/V), al cual se añadió dos gotas de Twen 80. Luego se enjuagó el material vegetal con abundante agua destilada estéril.

Las yemas apicales con dos nudos visibles se aislaron y se inocularon en tubos de cultivo que contenían 10 mL de medio de cultivo de establecimiento, similar al anterior, pero en esta ocasión suplementado con PVPP (250 mg.L⁻¹) como único antioxidante. Los cultivos se incubaron en una cámara de luz artificial a temperatura de 26±1°C e intensidad de luz de 35.7 μmol.m⁻².s⁻¹ con fotoperíodo de 16 horas luz. Al cabo de los 45 días se evaluaron el porcentaje de contaminación, la frecuencia de fenolización y brotación, así como el número de brotes formados por explante.

Análisis estadístico

El procesamiento de los datos y el análisis estadístico se realizó mediante el SPSS versión 8.0 para Windows, partiendo de un Análisis de Varianza (ANOVA) y de la prueba de Duncan, para determinar el nivel de

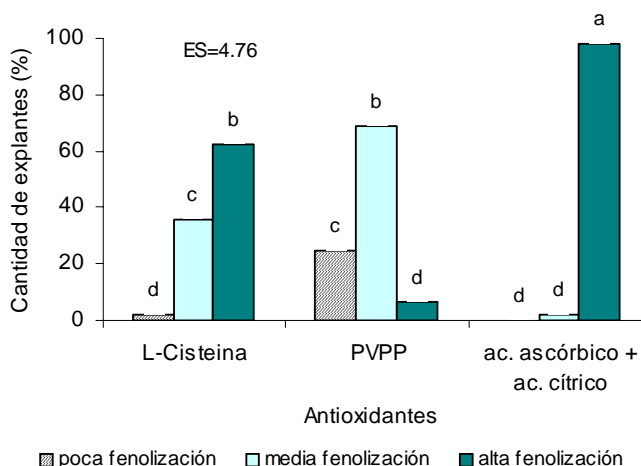
significación estadística de las diferencias entre las medias. Con el objeto de lograr distribución normal en los datos, las variables que se encontraban expresadas en porcentaje se transformaron para su análisis según la ecuación: $x' = 2 \cdot \arcsen((x/100)^{0.5})$. Para las variables discretas se utilizó la ecuación: $x' = (x + 0.5)^{0.5}$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Empleo de diferentes agentes antioxidantes

El 100 % de las yemas en todos los tratamientos manifestó síntomas de fenolización, pero no a igual intensidad. En la Figura 1 se observa el nivel de fenolización de las yemas de guayaba, expresado como el porcentaje de explantes que se encuentran en cada una de las escalas cualitativas evaluadas para cada tratamiento.

Se puede apreciar cómo las yemas de la mezcla de ácido ascórbico y ácido cítrico reflejaron los mayores porcentajes de explantes clasificados con un alto índice de fenolización (97.8 %), el cual difiere significativamente del resto de los tratamientos y demuestra la ineficiencia de estos compuestos en el control de este fenómeno en las yemas de guayaba.



Barras con letras iguales, las medias no difieren significativamente según ANOVA y prueba de Duncan, para $p < 0.05$ y $n = 30$

Figura 1. Efecto de diferentes agentes antioxidantes en el nivel de fenolización de yemas de árboles de campo de guayaba (*Psidium guajava* L.) luego de 72 horas de cultivo *in vitro*

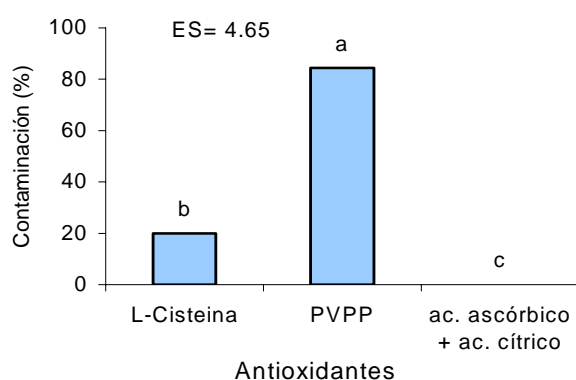
Para las yemas cultivadas en L-cisteína, se clasificaron el 62.2 % de los explantes con un alto nivel de fenolización, mientras que solo el 35.6 % poseía un nivel medio. Los niveles más bajos de fenolización se obtuvieron con la utilización del PVPP, el cual propició una clasificación más heterogénea de los explantes, dando lugar a un 24.4 % de explantes poco fenolizados y un 68.9 % medianamente fenolizados, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos en ambas categorías. Además, se observó que solo un 6.7 % de los explantes se clasificaron como de alto índice de fenolización, valor

que difiere del resto de los tratamientos. El uso del PVPP es muy señalado en la literatura especialmente en guayaba (4, 5, 10). Sus características como polímero le confieren funciones adsorbtivas específicas para determinadas moléculas de compuestos orgánicos, como son los fenoles, los cuales son adsorbidos por el PVPP a través de las moléculas de hidrógeno, previniendo así la oxidación de estos y la polimerización (6). El PVPP a 250 mg.L^{-1} fue el antioxidante más apropiado en la reducción de compuestos fenólicos de guayaba, a diferencia del ácido cítrico y el ácido ascórbico, los cuales resultaron en una respuesta muy pobre (10).

En este trabajo la fenolización se caracterizó por un cambio en la coloración del tejido vegetal y la emisión de estos pigmentos rojizos o carmelitas hacia el medio de cultivo. Estos se tornaron muy intensos hasta alcanzar un color vino-oscuro, especialmente para el tratamiento con la mezcla de ácidos ascórbico y cítrico. Este nivel de fenolización llegó a provocar la muerte de los explantes.

Entre las causas que provocan este estado se encuentra el daño que se produce en la superficie del explante después de realizado un corte o herida, y en otros casos, la senescencia o muerte de algunas células (6). Se asegura que la biosíntesis de compuestos fenólicos es afectada por situaciones de estrés, tales como heridas o ataques de patógenos (11). En manzana (*Malus* sp.), diversos tipos de heridas en frutos y hojas promueven la acumulación de ácido clorogénico y flavonoles vía activación de la enzima fenilalanina-amonioliasa (PAL) (11).

Es importante señalar que el éxito del establecimiento *in vitro* de las yemas en este experimento se vio limitado, debido a la alta contaminación que existió (Figura 2) de manera especial en los tratamientos donde los niveles de fenolización fueron más bajos.



Barras con letras iguales, las medias no difieren significativamente según ANOVA y prueba de Duncan, para $p < 0.05$ y $n = 30$

Figura 2. Porcentaje de contaminación de las yemas de árboles de campo de guayaba (*Psidium guajava* L.) luego de 72 horas de iniciado el cultivo *in vitro*

Se puede apreciar cómo los mayores valores en el porcentaje de contaminación (84.4 %) se alcanzaron en el caso del PVPP, el cual difiere significativamente del resto de los antioxidantes, tratamiento que a su vez mostró los menores índices de fenolización (Figura 1). Por su parte, la L-cisteína mostró un 20.0 % de contaminación mientras que para la mezcla de antioxidantes (ácido ascórbico + ácido cítrico) no existió crecimiento de microorganismo alguno. Este resultado reafirma las características antisépticas de los exudados fenólicos de la guayaba, los cuales tienen una amplia repercusión en la medicina tradicional (12). Se asegura que extractos de corteza y hojas de guayaba tienen acción *in vitro* contra numerosas bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Shigella*, *Salmonella*, *Bacillus*, *E. coli*, *Clostridium* y *Pseudomonas*. También tienen actividad contra hongos y levaduras (13).

Las plantas con flores, los helechos, musgos y muchos microorganismos contienen diversos tipos de fenoles. Con importantes excepciones, se desconocen las funciones de la mayoría de estos compuestos. Sin embargo, todos poseen un anillo aromático al que se unen diversos grupos sustituyentes, como el hidroxilo, u otras estructuras cíclicas no aromáticas (14), las cuales le confieren propiedades antimicrobianas. Por otra parte, los ácidos fenólicos son intermediarios del metabolismo fenilpropanoide (15). Estos también son precursores de la síntesis de la lignina (16) y fitoalexinas fenilpropanoides (17). La producción de estas sustancias constituye un mecanismo de defensa importante para las plantas superiores (18).

La toxicidad de los fenoles exudados al medio por los explantes de guayaba, provocó que en los tratamientos donde la fenolización fue superior, la contaminación fuera nula. Por ello, resultaría interesante estudiar en el futuro el efecto de estos exudados fenólicos de la guayaba, como suplemento en el medio de cultivo *in vitro* de otras especies con problemas de contaminación sistémica o incluso de bajo ritmo de crecimiento y proliferación, pues en algunos cultivos estas sustancias favorecieron el crecimiento. Para la caña de azúcar, por ejemplo, se encontró una estrecha relación entre la formación de brotes y la excreción de fenólicos en el cultivo de inmersión temporal en medio líquido y también se demostró que los factores que promueven la formación de brotes incrementan la excreción de fenoles (19).

Para los explantes de guayaba la fenolización resultó ser perjudicial, pues finalmente provocó la muerte de los explantes, excepto para aquellos tratados con PVPP que no se contaminaron. Por ello, se reconoce este antioxidante como el más adecuado para emplear en el cultivo de tejidos *in vitro* de yemas de guayaba. A pesar de ello, el crecimiento de los explantes que sobrevivieron fue lento y al cabo de tres a cuatro subcultivos, se produjo la caída de las hojas abiertas y finalmente murieron. Por ello, se hizo imprescindible buscar otras yemas que fueran explantes más apropiados.

Análisis del contenido de fenoles en yemas de diferentes partes del árbol de guayaba y su relación con el establecimiento *in vitro*

En el caso de la guayaba, tal y como se observó en el experimento anterior, la eficiencia en el establecimiento *in vitro* es baja y se necesita buscar otros tipos de explantes que permitan mayor éxito. En la Tabla I se puede apreciar el contenido de fenoles ligados a la pared, solubles en la planta y totales de las yemas colectadas de diferentes partes del árbol de guayaba, cuando se utilizaron diferentes formas de hacer la colecta con nitrógeno líquido, PVPP 0.5 % (M/V) o agua destilada estéril, como disoluciones (Tabla I).

Tabla I. Contenido de fenoles en yemas apicales de brotes de diferentes partes del árbol de guayaba, colectados en nitrógeno líquido, agua destilada estéril y en una disolución de PVPP al 0.5 % (Valor promedio en mg.g⁻¹ de masa fresca)

| A) Disolución para colectar | B) Origen del explante | Solubles en la planta | Ligados a la pared celular | Totales |
|-----------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------------|----------|
| Nitrógeno líquido | Copa | 120.30 a | 109.02 a | 229.32 a |
| | Tronco | 118.94 a | 69.39 b | 188.33 b |
| | Raíz | 82.95 b | 70.15 b | 153.11 c |
| PVPP (0.5 %) | Copa | 59.47 c | 33.11 d | 92.58 d |
| | Tronco | 42.99 e | 30.76 d | 73.75 e |
| | Raíz | 33.45 f | 32.35 d | 65.79 f |
| Agua estéril | Copa | 60.87c | 33.56 d | 94.43 d |
| | Tronco | 49.05 d | 39.39 c | 88.45 d |
| | Raíz | 43.11 e | 33.26 d | 76.37 e |
| ES | | 2.02 | 1.93 | 5.62 |

Medias con letras iguales no difieren significativamente según ANOVA y Duncan, para $p < 0.05$

El contenido de fenoles de los explantes que se colocaron en nitrógeno líquido, o sea, al instante de ser colectados en el campo, refleja de manera precisa la cantidad de estos compuestos que posee cada uno de estos tipos de explantes *in situ*. Se aprecia que, en sentido general, la guayaba posee un alto contenido de compuestos fenólicos, que representa para las yemas de la copa más del 20 % de la materia contenida en un gramo de tejido vegetal fresco. Sin embargo, no ocurre igual con las yemas tomadas de las otras partes del árbol.

El mayor contenido de fenoles totales, el cual difiere significativamente del resto de los tipos de explantes, lo tienen las yemas de brotes de la copa del árbol. Le continúan en orden descendente las yemas de rebrotes del tronco y las yemas de los rebrotes de la raíz. Estos resultados, sin lugar a dudas, reflejan la influencia que tiene el estado fisiológico del vegetal en el contenido de fenoles en los tejidos. Las yemas de los brotes con características más juveniles (rebrotes de la raíz) son los que poseen un menor contenido de fenoles.

La presencia de ácidos hidroxicinámicos, como el ácido ferúlico y otros grupos de compuestos fenólicos en la pared celular, que juegan un papel importante en el endurecimiento de esta (11), justifica el que los rebrotes del tronco y la raíz posean un contenido de fenoles ligados a la pared significativamente menor que los brotes de la copa del árbol, pues los primeros a diferencia de estos últimos se encontraban en crecimiento vigoroso, para lo cual las paredes celulares requieren de cierta plasticidad (20).

Al analizar los resultados cuando la colecta se realizó con agua destilada estéril o PVPP, se observa que en todos los tipos de explantes el contenido de fenoles es significativamente menor en comparación con el que reflejan los datos para el nitrógeno líquido. Este aspecto es importante, pues se reconoce que la mayor cantidad de estos compuestos se exudan a las soluciones, a partir de una oxidación de aquellos que se encuentran ligados a la pared y los que se encuentran solubles en las vacuolas (6). La diferencia que se observa entre los valores totales de uno y otro radica fundamentalmente en la exudación que ocurrió durante el tiempo que se mantuvieron sumergidos en estas soluciones.

A pesar de lo anterior, el contenido de fenoles totales continúa siendo significativamente mayor en los explantes provenientes de la copa del árbol. El PVPP, por su parte, mostró ser una mejor opción para colectar los explantes de guayaba que el agua estéril. Las yemas colectadas en este antioxidante manifestaron un menor contenido de fenoles totales independientemente del origen de estas, a excepción de las yemas de los brotes de la copa, las cuales continuaron con valores altos, aunque significativamente menor que para las colectadas con agua destilada estéril.

Se observa también que el contenido de fenoles ligados a la pared es algo similar para todos los tipos de explantes, independientemente de la disolución de colecta, mientras que los fenoles solubles son los que tienen una mayor diferencia e incidencia en los totales. Esto está dado fundamentalmente porque la movilización de estos compuestos a partir de las estructuras celulares rígidas tiene un límite, el cual asegura la no desaparición total de estas (20).

Se asegura que tejidos juveniles son menos propensos a la fenolización durante la escisión que aquellos tejidos más viejos (6). Esto es debido al nivel de diferenciación alcanzado por aquellos tejidos maduros, donde la concentración de sustratos apropiados para las enzimas fenolasa y polifenoloxidasas en las vacuolas es más alta. También plantea que en los árboles leñosos deciduos se obtiene un gradiente de madurez que aumenta a medida que se asciende por el árbol. Así, los brotes que se obtienen más próximos al nivel del suelo, suelen tener características más juveniles.

Estos resultados permiten suponer que el contenido de compuestos fenólicos de los tejidos puede servir como marcador del grado de madurez en esta especie. De hecho, las diferencias que existen entre los órganos juveni-

les y maduros no solo están asociadas a su morfología y estructura, sino también a sus procesos metabólicos de síntesis y degradación. Se plantea que en el olivo los grupos de proteínas que existen en tejidos juveniles y adultos, tanto dentro del mismo árbol como entre árboles separados, son cualitativamente similares pero cuantitativamente diferentes (21). Se ha relacionado el contenido de fenoles de ocho clones de castaña cultivados *in vitro* con: el estado maduro o juvenil, el origen topofísico y la capacidad de enraizamiento (22). Ellos detectaron un tanino condensado en el material maduro que no apareció en el material juvenil, indicando que este puede ser usado como un marcador cualitativo en el desarrollo de esta especie leñosa.

En la Tabla II se observa el efecto del origen de los explantes en el establecimiento *in vitro*, de acuerdo con el porcentaje de ocurrencia de contaminación, fenolización, brotación, así como del número de brotes emitidos por explante.

Tabla II. Efecto del origen topofísico de las yemas de guayaba (*Psidium guajava* L.) en el establecimiento *in vitro* luego de 45 días de iniciado el cultivo

| Origen del explante | Contaminación (%) [x'=2·arcsen((x/100)**0.5)] | Fenolización (%) [x'=2·arcsen(x/100)**0.5] | Brotación (%) [x'=2·arcsen((x/100)**0.5)] | No. brotes/yema [x'=(x+0.5)**0.5] |
|---------------------|--|---|--|--------------------------------------|
| Copa | 16.0 [0.645] | 98.0 [3.013 a] | 8.0 [0.371 b] | 1.00 [0.748 b] |
| Tronco | 28.0 [1.104] | 68.0 [2.054 b] | 16.0 [0.742 b] | 1.20 [0.825 b] |
| Raíz | 24.0 [1.016] | 16.0 [0.742 c] | 64.0 [1.861 a] | 1.56 [1.161 a] |
| ES | 3.305 [0.109] | 9.251 [0.275] | 7.001 [0.194] | 0.130 [0.038] |
| Sig. | NS | +++ | +++ | +++ |

Medias con letras iguales no difieren significativamente según ANOVA y Duncan para $p < 0.05$ y $n=25$, los datos transformados según ecuación aparecen entre corchetes. NS: no significativo

En sentido general, se observa que el uso de las yemas de rebrotes de la raíz como explantes para iniciar el cultivo *in vitro* permite reducir el fenómeno de la fenolización significativamente. Esto ocurre sin provocar incrementos marcados en los niveles de contaminación, a pesar de ser un explante que está muy próximo al nivel del suelo.

Por su parte, la brotación de las yemas ocurre significativamente con mayor frecuencia en los explantes provenientes de la raíz que en los explantes de la copa y el tronco, los cuales no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí. El número de brotes emitidos por yema apical es de igual forma significativamente superior en los brotes más juveniles (rebrotes de raíz), o sea, en los que demostraron tener menor contenido de fenoles (Tabla I). En general, en los explantes de ápices de guayaba, es muy frecuente la brotación y el crecimiento de una a dos yemas, debido principalmente a la dominancia apical ejercida por el primordio que logra brotar primero (5). Este aspecto hace que a pesar de que el porcentaje de formación de brotes sea alto o bajo en extremos, el número de brotes por explante no muestre valores muy distantes, aunque sí significativos para $p < 0.05$ en este caso.

La selección de material vegetal (tejidos con características fisiológicas juveniles apropiadas) dentro del cuerpo de un árbol maduro, puede ser un factor limitado en plantas que poseen una baja eficiencia en el establecimiento *in vitro*. Se ha demostrado que la capacidad de

multiplicación *in vitro* de los explantes obtenidos a partir de material colectado en la base de los árboles de castaña es superior al de los explantes colectados en las ramas de la copa de los mismos árboles (22). Por otra parte, en la producción de microinjertos de árboles elites seleccionados de *Pinus radiata*, se demostró que el estado ontogenético del material vegetal tiene mayor importancia que la edad cronológica, para el éxito en el establecimiento *in vitro* (23).

En este experimento, las pocas yemas de los brotes de la copa y el tronco que fueron capaces de brotar, adquirieron con el tiempo un cierto grado de endurecimiento y apariencia hiperhídrica. Al cabo de cinco a seis meses de cultivo mueren sin progresar en su crecimiento y desarrollo. Mientras tanto los explantes logrados a partir de la proliferación de las yemas con origen en los rebrotes de la raíz del árbol, mantienen un ritmo de crecimiento normal y coeficientes de multiplicación promedio de 3.7 luego de cuatros subcultivos.

En sentido general, el uso de las yemas de rebrotes de la raíz como explantes para iniciar el cultivo *in vitro* permitió superar las barreras de la fenolización y brotación significativamente. Estos resultados demuestran que se trata del explante más apropiado para iniciar el cultivo *in vitro* en la micropropagación de la guayaba variedad Enana Roja Cubana EEA 18-40.

CONCLUSIONES

Se reconoce el PVPP 0.5 % (M/V) como el antioxidante más adecuado para emplear en el cultivo de tejidos *in vitro* de yemas de guayaba, pues permitió que un 24.4 % de los explantes estuvieran poco fenolizados y que el 68.9 % estuviera medianamente fenolizados, al cabo de 72 horas de iniciado el cultivo, además de que con este antioxidante las yemas colectadas manifestaron un menor contenido de fenoles totales independientemente del origen de estas.

Las yemas de los brotes con características más juveniles (rebrotes de la raíz) son las que poseen el menor contenido de fenoles y el uso de estas como explantes para iniciar el cultivo *in vitro* permitió superar las barreras de la fenolización y brotación significativamente, lo cual demostró que existe una relación estrecha entre el origen del explante, su contenido de fenoles y el éxito del establecimiento *in vitro*.

REFERENCIAS

1. Peña, H. A.; Diaz, J. A. y Martinez, T. R. Fruticultura tropical. La Habana : ICFES. 1996. 208 p.
2. Mohamed-Yasseen, Y.; Barringer, S. A.; Schnell, R. J. y Splittstoesser, W. E. *In vitro* shoot proliferation of guava (*Psidium guajava* L.) from germinated seedlings. *Plant Cell Report*, 1995. vol. 14, p. 525-528.
3. Ramírez, M.; León, S. y Urdaneta, A. Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Nierdz. *Rev. Fac. Agron.*, 1999. vol. 16, p. 243-255.
4. Ali, N.; Mulwa, R. M. S.; Norton, M. A. y Skirvin, R. M. Micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2003, vol. 78, no. 5, p. 739-741.
5. Pérez, A. T.; Nápoles, L.; Concepción, O. y Trujillo, R. Multiplicación *in vitro* de brotes de guayaba (*Psidium guajava* L.) var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 obtenidos a partir de semilla. *Cultivos Tropicales*, 2002. vol. 23, no. 3, p. 57-61.
6. George, E. F. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd, 1993, 524 p.
7. Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 1962, vol. 15, p. 473-497.
8. Ramírez, M. C. y Salazar, E. G. Método de desinfección y efecto de citocininas en el cultivo *in vitro* de segmentos de hojas de *Psidium guajava* L. *Rev. Fac. Agron.*, 1998, vol. 15, p. 162-173.
9. Gurr, S. I.; Mc Pherson, M. I. y Bowles, D. J. Lignin and associated phenolic acids in cell walls. *Molecular Plant Pathology and Practical Approach*, 1992. no. 3, p. 62-69.
10. Siddiqui, Z. M. y Farooq, S. A. Role antioxidants in the elimination of phenolics compounds from the *in vitro* cultures of *Psidium guajava* L. (Guava). *Ad. Plant Sci.*, 1996, vol. 9, no. 2, p. 155-158.
11. Treutter, D. Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regulation*, 2001. vol. 34, p. 71-89.
12. Jaiarj, P.; Khoahaswan, P.; Wongkrajang, Y.; Peungvichia, P.; Suriyawong, P.; Saraya, M. I. y Ruangsomboon, O. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. leaf extract. *J. Ethnopharmacol.*, 1999. nov. 1, vol. 67, no. 2, p. 203-212.
13. Taylor, L. Herbal secrets of the rainforest. 2^{da} Edición. Sage Press, 2002. 254 p.
14. Salisbury, F. B. y Ross, C. W. Fisiología vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica S.A. 1992. p. 339-451.
15. Jorrín, J. V. y Prats, E. Allelochemicals, phytoalexins and insect-feeding deterrents: different definitions for 7-hydroxylated Coumarins. En: Recent advances in allelopathy. A science for the future. Cádiz: Servicios de Publicaciones-Universidad de Cádiz, 1999. p. 179-192.
16. Lewis, N. y Yamamoto, E. Lignins: occurrence, biosynthesis and biodegradation. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 1990, vol. 41, p. 455-496.
17. Bernards, M. A.; Susag, L. M.; Bedgar, D. L.; Anterola, A. M. y Lewis, N. G. Induced phenylpropanoid metabolism during suberization and lignification: a comparative analysis. *J. of Plant Physiol.*, 2000, vol. 157, no. 6, p. 601-607.
18. Sudha, G. y Ravishankar, G. A. Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002. vol. 71, no. 3. p. 181-212.
19. Lorenzo, J. C.; Blanco, M. A.; Peláez, O.; González, A.; Cid, M.; Iglesias, A.; González, J.; Escalona, M.; Espinosa, P. y Borroto, C. G. Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2001, vol. 65, p. 1-8.
20. Cosgrove, D. J. Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol. Biochem.*, 2000. vol. 38 no. 1/2, p. 109-124.
21. Garcia, J. I.; Avidan, N.; Troncoso, A.; Sarmiento, R. y Lavee, S. Possible juvenile-related proteins in olive tree tissues. *Scientia Horticulturae*, 2000. vol. 85, p. 271-284.
22. Fernández-Lorenzo, J. I.; Rigueiro, A. y Ballester, A. Polyphenols as potential markers to differentiate juvenile and mature chestnut shoot cultures. *Tree Physiology*, 1999, vol. 19, p. 461-466.
23. Fraga, M. F.; Cañal, M. J. y Rodríguez, R. *In vitro* morphogenic potential of differently aged *Pinus radiata* trees correlates with polyamines and DNA methylation levels. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002, vol. 70, no. 2, p. 139-145.

Recibido: 14 de octubre de 2003

Aceptado: 21 de octubre de 2004