

MULTIPLICACIÓN *In Vitro* DE BROTES DE GUAYABA (*Psidium guajava* L.) VAR. ENANA ROJA CUBANA EEA 18-40 OBTENIDOS A PARTIR DE SEMILLAS

Aurora T. Pérez[✉], Lelurlys Nápoles, O. Concepción y R. Trujillo

ABSTRACT. The guava is considered one of the most valuable tropical fruits. The propagation of this species is carried out by means of stakes; however, it is a low efficiency method because a high phenolization impedes good rooting and, on the other hand, because of the limited existence of plant donors in some cultivars. The implant is severely affected by environmental contamination; therefore, its use has little success to obtain a lot of plants. The seed constitutes another conventional propagation method. The micropropagation of this species arises as a better alternative of quick propagation, that allows to carry out physiological studies of rejuvenation and aging to obtain productive plants in a short time. The present work has the objective to study the multiplication phase of *Psidium guajava* L. var. «Enana Roja Cubana» EEA 18-40, starting from apexes and nodal segments of *in vitro* plants. The best results were reached when the apical segments were used as explants and put in a MS medium supplemented with 0.5 mg.L⁻¹ BAP for 30 days, obtaining a multiplication coefficient of 4.03.

RESUMEN. La guayaba se considera como una de las frutas tropicales más valiosas. La propagación de esta especie se lleva a cabo mediante el uso de estacas; sin embargo, es un método de baja eficiencia, debido a que una alta fenolización impide el buen enraizamiento y, por otro lado, la existencia limitada de plantas donadoras en algunos cultivares. El injerto y acodo se afectan severamente por la contaminación ambiental, por lo que se emplean con poco éxito para obtener grandes cantidades de plantas. La semilla constituye otro método de propagación convencional. La micropropagación de esta especie surge como alternativa superior de la propagación rápida, que permite realizar estudios fisiológicos de rejuvenecimiento y envejecimiento para la obtención de plantas productivas en un plazo de tiempo corto. El presente trabajo tuvo como objetivo optimizar la fase de multiplicación de *Psidium guajava* L. var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 a partir de ápices y segmentos nodales de plantas cultivadas *in vitro*. Los mejores resultados se alcanzaron cuando se utilizaron como explantes los segmentos apicales y se colocaron en medio MS con el suplemento de 0.5 mg.L⁻¹ de BAP durante 30 días, lográndose un coeficiente de multiplicación de 4.03.

Key words: guava, *in vitro* culture, micropropagation

Palabras clave: guayaba, cultivo *in vitro*, micropropagación

INTRODUCCIÓN

La guayaba es considerada como una de las frutas tropicales más valiosas, por su elevado contenido de vitamina C, que en ocasiones sobrepasa los 400 mg en 100 g de pulpa (1). Esto puede estar asociado al cultivar, al grado de madurez del fruto y a la época del año (2). Además, posee abundantes fibras, vitamina A, pectina, fósforo, calcio y potasio (3, 4, 5), así como un fuerte aroma atribuido a los compuestos carbonilos (6).

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, Hawaii, Brasil, Puerto Rico, Estados Unidos y en Cuba, donde 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 fenolización impide el buen enraizamiento (7, 8, 9) y, por otro lado, la existencia limitada de plantas donantes, en algunos cultivares. El injerto y acodo se ven afectados severamente por la contaminación ambiental (10), por lo que son empleados con poco éxito para producir grandes cantidades de plantas. La semilla constituye otro método de propagación convencional, aunque se plantea que posee variabilidad genética; no obstante, puede utilizarse para realizar estudios fisiológicos de las plantaciones.

La guayaba como muchas otras plantas puede propagarse con el empleo de las técnicas de cultivo *in vitro*, las cuales han mostrado resultados altamente ventajosos en la propagación rápida de diversas especies económicamente importantes. El presente trabajo tuvo como objetivo optimizar la fase de multiplicación de *Psidium guajava* L. var. Enana Roja Cubana EEA 18-40, a partir de ápices y segmentos nodales de plantas cultivadas *in vitro*.

Aurora T. Pérez, Reserva Científica; Lelurlys Nápoles, Especialista; O. Concepción, Investigadora y Dr.C. R. Trujillo, Investigador Auxiliar del Laboratorio de Ingeniería Metabólica, Centro de Bioplantitas, carretera a Morón km 9, CP 69450, Ciego de Ávila.

✉ aperez@bioplantitas.cu

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal se utilizaron frutos de la especie *Psidium guajava* L. variedad Enana Roja Cubana EEA 18-40 de una plantación de siete años de edad. Las semillas se extrajeron y se sometieron a un proceso de secado a temperatura ambiente durante 10 días. Al cabo de este tiempo se lavaron con abundante agua y detergente (1 %); la desinfección se realizó con hipoclorito de calcio al 2.0 % (p/v) durante 30 minutos y se enjuagaron varias veces con agua destilada estéril para eliminar los residuos del desinfectante. La siembra se realizó en el medio basal MS (11) con el suplemento de 100 mg.L⁻¹ de i-inositol, 1 mg.L⁻¹ de tiamina y 30 g.L⁻¹ de sacarosa.

Para los experimentos de la fase de multiplicación se utilizaron brotes provenientes de semillas germinadas *in vitro*, que poseían de dos a tres pares de hojas verdaderas. A estas se les tomaron dos tipos de explantes:

- 1) los segmentos apicales con dos pares de hojas visibles, una abierta y otra cerrada, sobre el ápice
- 2) nudos o segmentos nodales con un par de hojas visibles y abiertas.

Los experimentos subsiguientes se basaron en los resultados de los anteriores.

Influencia de diferentes citoquininas y el tipo de explante en la fase de multiplicación. Los explantes se colocaron, manteniendo la polaridad, en medio MS (11) con suplemento de 5 μmol de diferentes citoquininas: 6-Bencilaminopurina (BAP), 6-Furfurilaminopurina (Kin), Thidiazuron (TDZ) y 2-Isopentiladenina (2iP).

A los 30 días se realizaron observaciones y evaluaciones a la altura de los explantes, número total de nudos, número de brotes, coeficiente de multiplicación y cambios morfológicos que aparecieron en los explantes. *Influencia de la concentración de BAP y el tipo de explante en la multiplicación.* El material vegetal se inoculó en medio basal MS (11), con el suplemento de diferentes concentraciones de BAP (0.5; 1.0 y 1.5 mg.L⁻¹), manteniendo su polaridad. A los 30 días se realizaron observaciones y evaluaciones de acuerdo con el número de brotes formados por explante inicial y al coeficiente de multiplicación alcanzado por cada tipo de explante.

Influencia del número de subcultivos en la multiplicación. Como explantes se utilizaron ápices con dos pares de hojas visibles, una abierta y otra cerrada sobre el ápice, y se colocaron en medio MS (11) con 0.5 mg.L⁻¹ de BAP. Estos se subcultivaron cada 30 días hasta llegar a seis subcultivos; en cada uno de los cuales se replicaban los explantes, dividiéndolos y transfiriéndolos a medio fresco idéntico al anterior.

Se realizaron observaciones y evaluaciones de acuerdo al coeficiente de multiplicación alcanzado por los explantes en cada subcultivo.

Influencia del tiempo de subcultivo en la fase de multiplicación. Se utilizaron ápices que tenían seis subcultivos y se transfirieron a medio de cultivo MS + 0.5 mg.L⁻¹ de BAP. Los tiempos de subcultivo empleados fueron de 30,

45 y 60 días. Al finalizar el tiempo de subcultivo en cada caso se realizaron observaciones y evaluaciones, de acuerdo con el número de entrenudos y coeficiente de multiplicación alcanzado para cada tiempo de subcultivo.

Se emplearon 30 explantes por tratamiento en cada experimento. En el procesamiento estadístico de los resultados se emplearon los análisis de varianza (ANOVA) simples y bifactoriales, así como la prueba T Student, los cuales se realizaron con el procesador SPSS versión 8.0 para Windows. Los datos que se encontraban expresados en porcentaje, se transformaron para su análisis según la ecuación: $x' = 2 \cdot \arcsen((x/100)^{0.5})$. Para las variables discretas se utilizaron las ecuaciones: $x' = (x^{**0.5})$ ó $x' = (x + 0.5)^{**0.5}$. Las comparaciones de las medias se realizaron por la prueba de Duncan para $p \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La contaminación microbiana es uno de los principales problemas que se presentan en el establecimiento *in vitro* de especies leñosas (12). No obstante, durante el desarrollo del experimento no se presentó contaminación microbiana; esto concuerda con lo planteado en la literatura (13, 14), donde la desinfección de las semillas se logró sin presentar contratiempos. Esto se debe a que las semillas son órganos que se encuentran en el interior del fruto y la presencia de microorganismos es muy limitada; por otro lado, la fuerte coraza que protege al embrión permite la utilización de agentes químicos con una mayor confianza, pues resulta difícil causarle daño.

Influencia de diferentes citoquininas y el tipo de explante en la multiplicación. En la Figura 1 se muestra el comportamiento de la altura de las plántulas en dependencia del tipo de explante y la citoquinina utilizada para cada tratamiento. Se puede apreciar que los mayores valores para este carácter se alcanzaron cuando se utilizaron como explantes los ápices, independientemente del tipo de citoquinina. No obstante, el mejor resultado se obtuvo con el BAP (2.17 cm), el cual presentó diferencias significativas con el resto de los tratamientos, seguido de la Kin (1.89 cm) y el 2iP (1.84 cm), los cuales no presentaron diferencias significativas entre sí.

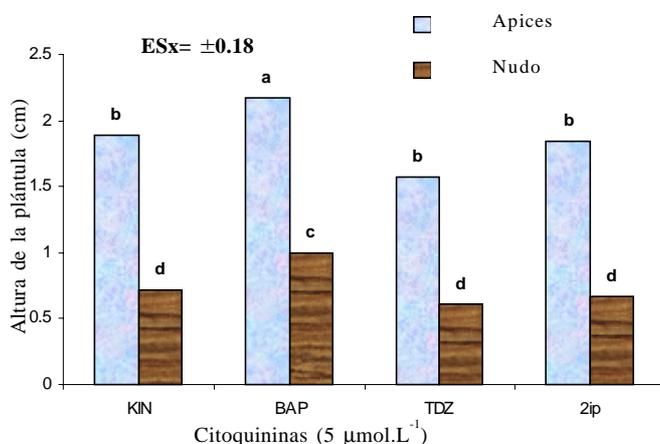


Figura 1. Influencia de diferentes citoquininas y el tipo de explante en la altura de la planta ($p < 0.05$)

El menor valor se obtuvo con el TDZ (1.57 cm). Para el caso de los nudos, fue necesaria la activación de las yemas axilares, las cuales por estar en número de dos, compiten por su desarrollo desde el punto de vista nutricional y hormonal. Por otro lado, se debe destacar que los segmentos nodales al brotar, alcanzaron una mayor altura en el medio de BAP (1.0 cm), el cual difirió significativamente del resto de los tratamientos en que se emplearon los nudos.

En la Figura 2 se observa el número de brotes por explante para cada tratamiento, donde el mejor resultado (1.84) se logró al usar como explantes los segmentos nodales y el BAP como citoquinina, difiriendo significativamente del resto de los tratamientos. Para el caso de los ápices se obtuvo brotación axilar cuando se empleó BAP y TDZ; sin embargo, esta resultó ser pobre (1.04 y 1.08 respectivamente). Esta respuesta está relacionada con la fortaleza de estas hormonas en la ruptura de la dominancia apical y la actividad de las citoquininas (15).

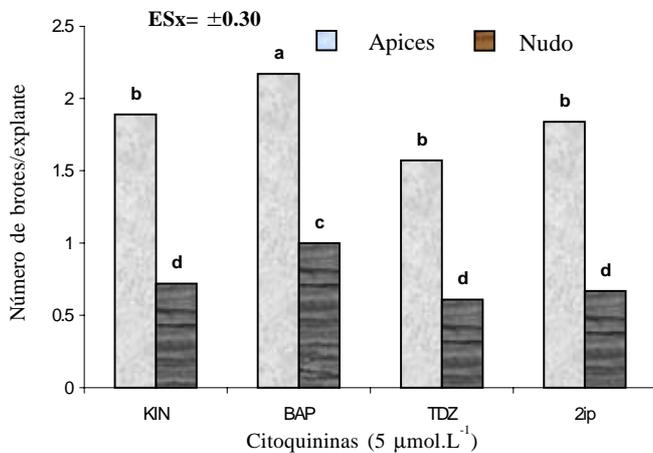


Figura 2. Influencia de diferentes citoquininas y el tipo de explante en el número de brotes por explante (p<0.05)

Más allá del interés en la formación de brotes, se puso de manifiesto la importancia que tiene el crecimiento de los explantes (altura y número de nudos) en la multiplicación, teniendo en cuenta el método utilizado (segmentos nodales). El análisis del coeficiente de multiplicación (interpretado como el número de explantes que se obtienen a partir de un explante inicial luego de 30 días de cultivo) para cada tratamiento puede apreciarse en la Figura 3. Los mejores resultados se obtienen al utilizar los ápices, donde el mayor valor se alcanzó cuando se empleó BAP (2.88), el cual difiere significativamente del resto de los tratamientos, seguido de la Kin (2.44) y el 2iP (2.14), sin diferencias significativas entre sí. El hecho de que los ápices posean mayor coeficiente de multiplicación que los nudos, se debe a la dominancia apical que caracteriza a este tipo de explante, lo cual favorece su crecimiento y por ende se incrementa el coeficiente, mientras que en los nudos las yemas axilares que se encuentran latentes se retrasan en su crecimiento y disminuye este parámetro.

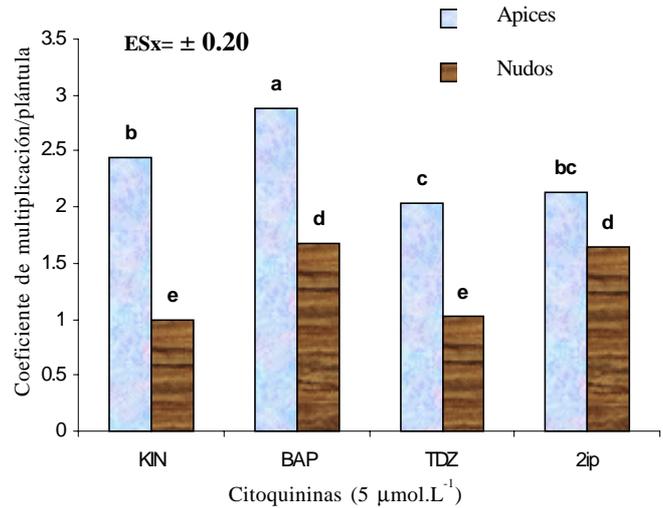


Figura 3. Influencia de diferentes citoquininas y el tipo de explante en el coeficiente de multiplicación por planta (p<0.05)

Es necesario hacer referencia a los cambios morfológicos que se evidenciaron en los explantes durante el desarrollo del experimento (Figura 4) al emplear las diferentes citoquininas. El TDZ provocó la formación de brotes a manera de rosetas, imposibilitando su individualización. En cuanto al uso de TDZ en el cultivo *in vitro*, se señaló la proliferación anormal de brotes axilares (14), efecto que se incrementa con el aumento de la concentración. El 2iP, por su parte, formó un engrosamiento en la base del tallo a manera de callo, del cual se formaron algunas raíces. La Kin también provocó la formación de raíces, pero esta vez directamente del tallo sin la formación de callo. En el caso del BAP, este provocó un alargamiento en los entrenudos del brote, que hizo que en ocasiones el tamaño del brote fuera superior al del explante inicial; además, produjo una reducción del área foliar de las hojas de los brotes.

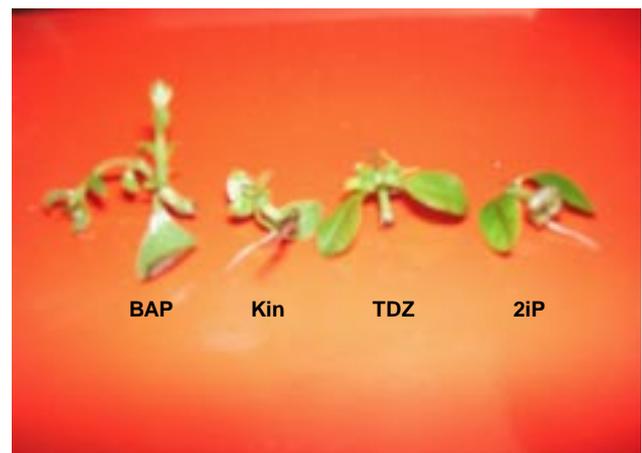


Figura 4. Cambios morfológicos ocurridos con el uso de diferentes citoquininas en segmentos nodales

Por todo lo anterior, se reconoce al BAP como el regulador del crecimiento más apropiado para la multiplicación de brotes de guayaba provenientes de semillas germinadas *in vitro*.

Influencia de la concentración de BAP y el tipo de explante en la multiplicación. En la Tabla I se muestra el resultado del número de brotes y el coeficiente de multiplicación, teniendo en cuenta el tipo de explante y la concentración de BAP. Como se observa el número de brotes fue superior cuando se emplearon como explante nudos y los mayores valores se presentaron cuando se utilizó 0.5 y 1.0 mg.L⁻¹ de BAP, sin diferencias significativas entre sí. Por su parte, los explantes de ápices exhibieron un menor número de brotes; sin embargo, para la concentración de 0.5 mg.L⁻¹ de BAP se obtuvieron 2.46 brotes por explante, valor relativamente elevado debido a que el crecimiento en este caso es fundamentalmente apical.

Tabla I. Influencia de diferentes concentraciones de BAP y el tipo de explante en el número de brotes y el coeficiente de multiplicación (p<0.05)

Tipo de explante	BAP (mg.L ⁻¹)	Número de brotes/explante	Coficiente de multiplicación
Ápices	Control	0.00 e*	2.07 a
	0.5	2.46 bc	2.17 a
	1.0	2.10 c	1.64 b
	1.5	2.25 bc	2.10 a
Nudos	Control	1.28 d	1.85 b
	0.5	3.03 a	1.82 b
	1.0	2.75 ab	1.39 c
	1.5	2.42 bc	1.17 d
Es \bar{x}		0.16	0.10

Esta respuesta se encuentra asociada con la estructura anatómica del explante. En el caso de los segmentos nodales, se rompe la dominancia apical y las dos yemas axilares se desarrollan, aunque lentamente. Por otro lado, los ápices mantienen una fuerte dominancia apical sobre las yemas axilares inferiores, las cuales no pueden desarrollar brotes laterales. Esta explicación se corrobora claramente con los resultados del tratamiento control, donde no ocurrió formación de brotes para los ápices y sí para los nudos.

Se lograron resultados satisfactorios (16) en la obtención de brotes axilares en *Psidium guajava* L., para lo cual se emplearon como explantes ápices y segmentos nodales en el medio de cultivo MS con el suplemento de 1 mg.L⁻¹ de BAP.

Resultados similares son los alcanzados con segmentos nodales y 1.0 mg.L⁻¹ de BAP (17) en la variedad de guayaba Chittidar, donde se obtuvieron de tres a cuatro brotes como promedio. Por su parte, otros autores (13) lograron una media de 3.2 y 1.29 brotes para nudos y ápices respectivamente cuando emplearon 0.1 mg.L⁻¹ de BAP. Algunos obtuvieron un 88 % de segmentos nodales brotados con el uso de 4 mg.L⁻¹ de BAP (18).

Algo muy diferente ocurre cuando analizamos el parámetro coeficiente de multiplicación, donde los mayores valores se corresponden de forma general con los ápices, sin presentar diferencias significativas entre los tratamientos control, 0.5 y 1.5 mg.L⁻¹ de BAP, aspecto que se encuentra estrechamente relacionado con el método de propagación desarrollado por segmentos nodales. Es necesario señalar que en el tratamiento sin regulador del crecimiento los explantes emitieron raíces, lo que entorpece el desarrollo de esta fase. En el caso de los nudos, los valores del coeficiente de multiplicación son bajos; esto se debe a que la talla que alcanzaron los brotes no permitieron su individualización. Además, se aprecia una tendencia a disminuir el coeficiente de multiplicación a medida que aumenta la concentración de la citoquinina.

De manera general, el tratamiento 0.5 mg.L⁻¹ de BAP mostró los mejores resultados al emplear como explantes los ápices en cuanto a las variables evaluadas. La formación de brotes permite que en subcultivos posteriores, estos puedan incrementar el coeficiente de multiplicación. **Influencia del tiempo de subcultivo en la multiplicación.** En la Tabla II se muestra la influencia del tiempo de subcultivo en el número de entrenudos por explante y en el coeficiente de multiplicación.

Tabla II. Influencia del tiempo de subcultivo en el número de entrenudos y coeficiente de multiplicación (p<0.05)

Tiempo de subcultivo	Número de entrenudos	Coficiente de multiplicación
30	3.50 c	4.03
45	5.36 b	3.66
60	6.16 a	4.10
ES \bar{x}	0.15	NS

Al analizar el número de entrenudos, se observó un aumento progresivo en función del tiempo de subcultivo. El mayor valor se alcanzó a los 60 días, el cual difiere significativamente del resto de los tiempos de subcultivo. Este aspecto está determinado por el crecimiento de los explantes, ya que la hormona se agota y hace que el efecto inhibitorio que ejercía sobre el crecimiento apical desaparezca, incrementándose de esta manera el número de entrenudos, los que resultaron ser muy cortos e impidiendo su individualización.

En cuanto al coeficiente de multiplicación en función del tiempo de subcultivo se muestra un comportamiento muy peculiar, pues sus valores están por encima de 3.5 en todos los tratamientos. El mayor valor se observó a los 60 días; sin embargo, no muestra diferencias significativas con el resto de los tratamientos.

Al analizar el comportamiento de ambos caracteres, no es posible asociar el coeficiente de multiplicación a la emisión de entrenudos, ya que este último es más bien el resultado de la formación de algunos brotes axilares con entrenudos cortos, que no pudieron ser separados del brote principal. Todo esto explica el porqué un incremento en el número de entrenudos no trajo consigo un aumento en el coeficiente de multiplicación.

Teniendo en cuenta lo antes planteado, se propone como el tiempo de subcultivo 30 días para desarrollar el sistema de propagación, pues aunque este tratamiento no mostró los mayores valores en cuanto al número de entrenudos, sí presentó resultados aceptables para el coeficiente de multiplicación; además, se ahorra tiempo.

CONCLUSIONES

- * De las citoquininas empleadas (Kin, BAP, TDZ, 2iP), la más efectiva en la multiplicación fue BAP a la concentración de 0.5 mg.L⁻¹.
- * Los mejores valores para el coeficiente de multiplicación se alcanzaron con los ápices.
- * El tiempo de subcultivo para alcanzar un coeficiente de multiplicación superior a 4 es 30 días.

REFERENCIAS

1. Peña, H. A.; Díaz, J. A. y Martínez, T. R. Fruticultura Tropical. ICFES, 1996. 208 p.
2. Mitra, S. K. y Bose, T. K. Guava. En: Fruits: Tropical and subtropical fruits. Calcuta : Naya Prokasu, 1985, p. 278-303.
3. Wilson, C. W. Guava. En: Tropical and sub-tropical fruits: Composition, properties and uses. AVI, Westport, CT. p. 279-299, 1980.
4. Yadava, U. L. Physicochemical properties of guava produced in Georgia. *Hort. Science*, 1994, vol. 29, p. 536-537.
5. Yadava, U. L. Guava production in Georgia under cold-protection structure. En: Progress in new crops. Arlington: ASHS Press, 1996. p. 451-457.
6. Morton, J. F. Fruit of warm climates, Miami: Morton Publ., 1987.
7. Marco, C. M.; Kersten, E. y Silva, J. G. C. da. Influência do ethephon e do ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento do estacas de ramas de goaibeira (*Psidium guajava* L.). En: Congresso Brasileiro de Fruticultura. Reunião Interamericana de Horticultura Tropical. Simpósio Internacional de Mirtáceas. (14,42:1996:Curitiba), 1996.
8. Siddiqui, Z. M y Farooq, S. A. Role of anti-oxidants in the elimination of phenolic compounds from *in vitro* culture of *Psidium guajava* L. (Guava). *Plant Sci.*, 1996, vol. 9, no. 2, p. 155-158.
9. León, S.; Arenas, L. y Viloría, Z. Effect of stock plant solar exposure on the *in vitro* culture initiation of guava (*Psidium guajava* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 1997, vol. 14, p. 47-53.
10. Vilchez, J.; Albany, N.; Gadea, J., Viloría, Z. y Castro, C. Propagación asexual de *Psidium guajava* L. mediante la técnica del acodo aéreo. En: Congreso Nacional de Fruticultura. (6:1997:Barquisimeto), 1997.
11. 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.
12. Ramírez, M.; León, S. y Urdaneta, A. Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* L y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 1999, vol. 16, p. 243-255.
13. Loh, C. S. y Rao, A. N. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from seedlings and grafted plants and adventitious shoot formation *in vitro*. *Scientia Hort.*, 1989, vol. 39, p. 31-39.
14. Mohamed-Yasseen, Y. *et al.*. *In vitro* shoot proliferation of guava (*Psidium guajava* L.) from germinated seedlings. *Plant Cell Report*, 1995, vol. 14, p. 525-528.
15. Huetteman, C. A. y Preece, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1993, vol. 33, p. 105-119.
16. Jaiswal, V. S. y Amin, M. N. *In vitro* propagation of guava from shoot culture of mature trees. *Plant Physiol.*, 1987, vol. 130, p. 7-12.
17. Amin, M. N. y Jaiswal, V. S. Micropropagation as an aid to rapid cloning of a guava cultivar. *Scientia Hort.*, 1988, vol. 36, p. 89-95.
18. Ramírez, M. y Salazar, E. *In vitro* establishment of guava (*Psidium guajava* L.) nodal segments. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 1997, vol. 14, p. 497-506.

Recibido: 9 de octubre del 2001

Aceptado: 18 de enero del 2002