

# Manejo de plantas madres para el cultivo in vitro de segmentos nodales del guayabo (*Psidium guajava* L.)<sup>1,2</sup>

Maribel Ramírez-Villalobos<sup>3</sup>, Silvia León de Sierralta<sup>4</sup>,  
Merylin Martín<sup>3</sup> y Alba Nava<sup>5</sup>

J. Agric. Univ. P.R. 88(1-2):73-89 (2004)

## RESUMEN

Se cultivaron in vitro segmentos nodales de guayabo recolectados de brotes de injertos adultos sobre patrones juveniles, plántulas a plena exposición solar y bajo sombra (40%), plantas adultas sin y con sombra (80%). También se cultivaron explantes de plantas adultas cultivadas en el campo bajo las siguientes condiciones: control; 60 días después de la aplicación de dormex (cianamida hidrogenada 49%) al 2% y 4%; 60 días después de poda parcial; y 75 días bajo 80% de sombra. A los 60 días de cultivo, las plántulas y plantas adultas bajo sombra produjeron 0% de explantes oscurecidos. El máximo porcentaje de explantes con brotes de yemas (PBY) (100%) se obtuvo a los 20 días en explantes de plántulas, y a los 40 días en explantes de plantas adultas bajo sombra. A los 60 días, las plantas adultas e injertadas sin sombra produjeron 35% y 40% de explantes oscurecidos, respectivamente, y 85 y 80% de explantes con brotes de yemas, respectivamente. El control registró 65% de explantes brotados; los tratamientos con dormex al 2% y 4%, 80% y 70%, respectivamente; la poda parcial, 65%. La aplicación de dormex al 2% incrementó el PBY y el porcentaje de explantes con hojas formadas comparada con los del control.

**Palabras clave:** guayabo, plántulas, cianamida hidrogenada, poda, sombreado

## ABSTRACT

**Management of stockplant for the in vitro culture of nodal segments of guava (*Psidium guajava* L.)**

**Nodal segments collected from shoots of adult grafts on juvenile rootstocks from seedlings grown under full sun and shade (40%), and from adult plants grown without and with shade (80%) were cultivated in vitro. In addi-**

<sup>1</sup>Manuscrito sometido a la Junta Editorial el 25 de mayo de 2001.

<sup>2</sup>Trabajo financiado parcialmente por CONDES bajo el proyecto No. 01736-98, 1790-00. Se agradece al Campo Experimental del CENFRUZU-CORPOZULIA por facilitar las plantas de guayabo y al Ing. Agr. Aly Urdaneta por su colaboración en la fase experimental del trabajo.

<sup>3</sup>Departamento de Botánica. Facultad de Agronomía. La Universidad del Zulia. Apartado 15205. Maracaibo, Zulia 4005. Venezuela. e-mail: mcramire@cantv.net, mcramire@starmedia.com, mcramire@luz.ve.

<sup>4</sup>Departamento de Química.

<sup>5</sup>Departamento de Agronomía.

tion, nodal segments from field grown plants were cultivated in vitro under the following conditions: control; sixty days after dormex (hydrogenated cyanamide 49%) application at 2% and 4%; sixty days after partial pruning; and 75 days of 80% shading. Sixty days after culture initiation, seedlings and adult plants under shade produced no browning explants. The highest percentage of budbreak (PBB) (100%) was obtained at 20 days in explants of seedlings; at 40 days in explants of adult plants under shade. At sixty days, adult and grafted plants without shade presented 40% and 35% browning explants, respectively, and 85% and 80% budbreak explants, respectively. At sixty days, the control treatment produced 65% budbreak; the dormex treatment with the concentrations of 2% and 4%, 80% and 70% PBB, respectively; the partial pruning, 65%. Dormex application at 2% increased PBB and percentage of leaves formed to more than that of the control.

**Key words:** seedlings, adult plants, hydrogenated cyanamide, pruning, shading

## INTRODUCCIÓN

El guayabo (*Psidium guajava* L.) es nativo de América Tropical, ubicado probablemente desde Perú hasta México. Actualmente se cultiva en más de cincuenta países en las zonas tropicales y subtropicales, incluyendo algunas áreas mediterráneas entre latitudes 35°N y 35°S. Los mayores productores de guayaba en el mundo son la India, Brasil y México. Otros principales países productores incluyen a Sur África, Jamaica, Kenya, Cuba, República Dominicana, Venezuela, Puerto Rico, Haití, Guyana, Colombia, E.E.U.U. (Hawaii y Florida), Taiwan, Egipto y las Filipinas (Tong y Khay, 1990). Esta especie presenta gran importancia debido a su notable expansión y a las características del fruto, ganando gran aceptación en los mercados nacionales e internacionales.

En Venezuela, para la década de los ochenta, el cultivo del guayabo pasa a ser uno de los rubros frutícolas de mayor importancia, dada la creciente demanda de la fruta en el mercado nacional. En 1992 se estimó una superficie sembrada de 4,000 ha, con rendimientos entre 25,000 y 30,000 kg/ha, que generaron cerca del 90% de la producción nacional, siendo Zulia el estado con mayor superficie y tradición en su producción (Araujo et al., 1997). Este frutal puede producir durante todo el año, con períodos de máxima y mínima, dependiendo de las condiciones climáticas y del manejo agronómico (Avilan et al., 1992).

La mayoría de los huertos comerciales se han establecido con árboles propagados por semillas, las cuales germinan fácilmente y en altos porcentajes. Este método de propagación genera variabilidad genética en las plantaciones y, por consiguiente, en la calidad de la fruta cosechada. También afecta debido a que en muchos casos no hay selección de árboles para la recolección de semillas (Hartmann y Kester, 1992). La variabilidad en las plantas se asocia al porcentaje de polinización cruzada que registra la especie (Soubihe y Gurdel, 1962). La propa-

gación asexual presenta varias dificultades, aunque se recurre a la injertación con resultados algo satisfactorios (Ramírez et al., 1999a).

El cultivo *in vitro* es un término amplio que se utiliza frecuentemente para referirse al cultivo aséptico de un protoplasto, célula, tejido u órgano bajo condiciones químicas y físicas controladas, y la micropropagación como la multiplicación masiva *in vitro*. Esta técnica tiene grandes aplicaciones en la propagación clonal, eliminación de patógenos, desarrollo de cultivares superiores y producción de bioquímicos o metabolitos. En frutales tiene mucho potencial en la multiplicación de selecciones de patrones y copas, especialmente de los cultivares para los cuales existe mucha demanda y poca oferta de material donante, limpieza sanitaria de enfermedades y como herramienta en el mejoramiento genético (Roca, 1992).

En guayabo, Papadatau et al. (1990) recomendaron la utilización de explantes procedentes de plántulas de semillas por presentar una alta tasa de multiplicación. Sin embargo, esta fuente de material vegetal no es conveniente cuando se desea propagar asexualmente y las semillas disponibles han sido obtenidas a través de polinización cruzada. En explantes de plantas adultas se ha encontrado que la tasa de multiplicación no es suficientemente alta para ser comercial (Amin y Jaiswal, 1988). También existen problemas de alta contaminación y oscurecimiento, y de baja viabilidad en los explantes, que impiden su establecimiento *in vitro* (Ramírez et al., 1999b). La posibilidad de cultivar *in vitro* segmentos nodales de plantas injertadas bajo condiciones controladas (Pírela y Mogo-llón, 1996) y de adultas cultivadas en el campo (Ramírez, 1998) ha sido demostrada. Sin embargo, existen varios factores, entre éstos la ontogenia de la planta madre, que pueden afectar la fase de establecimiento. El desarrollo de un protocolo que permita propagar *in vitro* material de plantas adultas seleccionadas facilitaría la multiplicación.

En términos generales, se indica que la micropropagación es relativamente fácil al emplear tejidos juveniles y progresivamente más difícil en tejidos en transición y adultos de la planta madre (Caso, 1992). Por tanto, para estimular los brotes en los explantes es necesario aplicar tratamientos a las plantas madres, tales como el sombreado (Sharma et al., 1995; Ramírez y León de S., 1997) que permite disminuir el oscurecimiento de los explantes, el rejuvenecimiento a través de injertación, el estaquillado, la poda severa o parcial y la colocación bajo condiciones ambientales controladas (Caso, 1992; Vieitez et al., 1994).

Los objetivos de este trabajo fueron evaluar el efecto de tratamientos a plantas madres, como poda parcial, cianamida hidrogenada y sombreado, y el efecto de la condición de la planta madre (injertada, plántula y adulta) en la viabilidad y formación de brotes de segmentos nodales del guayabo cultivados *in vitro*.

### MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal para este trabajo provino de plantas de guayabo Tipo "Criolla Roja" cultivadas en el campo Experimental del CEN-FRUZU-CORPOZULIA, ubicado en el Municipio Mara del Estado Zulia, Venezuela. La metodología estuvo conformada por dos experimentos.

*Experimento 1. Condición de la planta madre (injertada, plántula y adulta) sobre la formación de brotes en segmentos nodales de guayabo cultivados in vitro*

Se recolectaron brotes terminales de 15 cm de longitud de plantas de guayabo bajo las siguientes condiciones: injertos adultos sobre patrones juveniles de 90 días de edad, plántulas de cinco meses bajo 40% de sombra y a plena exposición solar, plantas adultas (cuatro años) en el campo sin tratamiento de sombra, y con 80 días bajo una malla que proporcionaba 80% de sombra. Los brotes permanecieron en cámara húmeda hasta su traslado al laboratorio, donde se les eliminaron las hojas, dejando parte del pecíolo para evitar dañar las yemas. Se prepararon segmentos nodales, con dos yemas axilares, correspondientes al tercer y cuarto nudo del brote para desinfectarlos superficialmente con la metodología descrita por Ramírez (1998): una hora en agua destilada jabonosa, 10 min en cloro comercial al 25% (hipoclorito de sodio 1.31%), tres enjuagues con agua destilada esterilizada, 20 min en 4 g/L de benlate (benomil 50%) y 20 min en 300 mg/L de rifampicina.

La siembra de los explantes se hizo en tubos de ensayo (150 mm × 25 mm) con 10 ml del medio nutritivo de Murashige y Skoog (MS) (1962) más 20 g/L de sacarosa y 7 g/L de agar. El pH del medio se ajustó a 5.8 antes de esterilizarlo a 121 °C y 1.1 kg/m<sup>2</sup> de presión por 15 min. Las condiciones de incubación fueron bajo luz fluorescente con irradiación de 19 µmol/m<sup>2</sup>s por 12 h de fotoperíodo y temperatura de 25 ± 1 °C. Se realizó un cambio a medio fresco a los 30 días.

El diseño experimental utilizado fue totalmente al azar con un arreglo en parcelas divididas en el tiempo con cuatro repeticiones y cinco explantes como unidad experimental. Las variables de estudio fueron porcentajes de explantes con hongos (PEH), bacterias (PEB), contaminados totales (PEC, bacterias y hongos), viables (PEV), oscurecidos (POS) o con oxidación fenólica, con brotes de yemas (PBY) y con hojas (PH). Los hongos se detectaron por medio de la presencia de micelio y las bacterias a través de los exudados presentes en el explante o en la base de éste, en contacto con el medio de cultivo. Se denominó explante viable aquél que presentaba color verde y explante no oscurecido aquél de color verde con oscurecimiento sólo en los cortes.

El experimento se evaluó a los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 días de cultivo. Las variables se transformaron con el arco seno  $(x+1)^{1/2}$  para ajustarlas a la normalidad. El análisis se llevó a cabo con el procedimiento GLM del programa SAS (1987) versión seis. Cuando hubo efectos significativos se aplicó la prueba de diferencias mínimas significativas (LSD).

*Experimento 2. Efecto de tratamientos a plantas madres adultas sobre la formación de brotes en segmentos nodales de guayabo cultivados in vitro*

En el campo se recolectaron brotes de 15 cm provenientes de plantas cultivadas en el campo sin ningún tratamiento (control); a 60 días después de la aplicación del producto comercial dormex al 2% y 4%; con 75 días bajo una malla de 80% de sombra e irradiación de 115  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ; y con 60 días de la poda parcial de la planta a una altura y radio de 2 m. Durante la fase de campo del experimento no hubo incidencia de lluvias. La aplicación de dormex (cianamida hidrogenada 49%) se efectuó en horas de la mañana con una asperjadora de espalda manual, evitando el punto de goteo del producto en las plantas. Se empleó aproximadamente medio litro por planta de la solución de dormex más agua.

El tipo de explante, procedimiento de desinfección superficial, medio de cultivo, condiciones de incubación, diseño experimental, repeticiones, unidad experimental, días de evaluación, análisis y transformación de las variables evaluadas fueron iguales a las del experimento uno. Las variables de estudio para este experimento correspondieron a POS, PEV, PBY y PH.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los efectos individuales de la condición (CPM), del tiempo de cultivo (TC) y la interacción entre la CPM y el TC no mostraron diferencias significativas en las variables porcentaje de explantes con bacterias (PEB), porcentaje de explantes contaminados totales (PEC), porcentaje de explantes viables (PEV) y porcentaje de explantes oscurecidos (POS). Sin embargo, la CPM tuvo un efecto significativo sólo en el POS (Cuadros 1 y 2). En todas las condiciones de la planta madre, el porcentaje de explantes con hongos fue de 0% y el PEC osciló entre 40% y 55%, asociado a la presencia de bacterias, aparentemente inocuas y que posiblemente estén presentes internamente en los tejidos (Ramírez et al., 2000).

Los resultados concuerdan con los trabajos de Pérez et al. (1994) en la especie ornamental *Fraxinus angustifolia*, donde la micropropagación de ápices y segmentos nodales fue exitosa al utilizar material procedente tanto de plantas adultas (10 años de edad) como juveniles germinadas in vitro. Aparentemente, en el guayabo la condición de la

CUADRO 1. *Análisis estadístico de las variables: porcentajes de explantes con bacterias (PEB), contaminados totales (PEC), viables (PEV) y oscurecidos (POS), a los 60 días de cultivo in vitro de segmentos nodales de guayabo (Psidium guajava L.). Experimento 1.*

Fuente de variación	%							
	PEB		PEC		PEV		POS	
	F	Pr > F						
Condición de la planta madre (CPM)	1.49 NS	0.2664	1.26 NS	0.2759	0.75 NS	0.5987	26.01**	0.0001
Tiempo de cultivo (TC)	1.74 NS	0.0719	1.77 NS	0.3739	1.49 NS	0.2515	0.57 NS	0.8459
CPM * TC	0.19 NS	0.7419	0.75 NS	0.4482	0.67 NS	0.6556	2.75 NS	0.0907

NS: No significativo.

\*\*Significativo  $P < 0.01$ .

CUADRO 2. Efecto de la condición de la planta madre (injertadas, plántulas y adultas) en los porcentajes de explantes con hongos (PEH), bacterias (PEB), contaminados totales (PEC), viables (PEV) y oscurecidos (POS), a los 60 días de cultivo in vitro de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.).

Condición de la planta madre	PEH	PEB	% PEC	PEV	POS
Injertos adultos/patronos juveniles	0	40 a <sup>1</sup>	40 a	95 a	35 a
Plántulas a plena exposición solar	0	55 a	55 a	100 a	0 b
Plántulas bajo 40% de sombra	0	50 a	50 a	100 a	0 b
Plantas adultas a plena exposición solar	0	40 a	40 a	90 a	40 a
Plantas adultas bajo 80% de sombra	0	45 a	45 a	100 a	0 b

<sup>1</sup>Medias con letras distintas difieren significativamente (P < 0.05).

planta madre no tuvo influencia en la contaminación y la viabilidad de los segmentos nodales, durante su establecimiento in vitro. Sin embargo, estos resultados no coinciden con los informes de Giladi et al. (1979), quienes lograron el mayor porcentaje de explantes asépticos con material procedente de plántulas de naranjo (*Citrus sinensis*). Estas diferencias pueden ser atribuidas a la técnica de desinfección superficial utilizada y a la especie.

Los explantes procedentes de injertos adultos sobre patronos juveniles y plantas adultas a plena exposición solar tuvieron los mayores valores en el POS. Este resultado se relacionó con el origen del material vegetal ya que se ha informado que la implantación in vitro de plantas leñosas y adultas se dificulta con el oscurecimiento de los explantes (Rey et al., 1991; Vilorio, 1993). Los porcentajes obtenidos en ambos tratamientos no se consideran altos al compararlos con el 75% reportado por Parra et al. (1991) en guayabo.

En las plántulas bajo condiciones de sombra o plena exposición solar y en las plantas adultas bajo sombreado prolongado, el POS fue de 0%. En las plántulas esta respuesta se relacionó a su condición juvenil y en plantas adultas al tratamiento de sombra que permitió controlar el oscurecimiento debido posiblemente a una disminución en la cantidad de compuestos fenólicos y de la actividad de la enzima polifenoloxidasas (Marks y Simpson, 1990; Sharma et al., 1995). Los resultados son análogos con otras investigaciones, donde con el sombreado de la planta madre se obtuvo menor oscurecimiento y mayor viabilidad de los explantes (Sharma et al., 1995; Ramírez y León de S., 1997).

La CPM, el TC y la interacción entre la CPM y el TC presentaron diferencias significativas en las variables de porcentaje de explantes con brotes de yemas (PBY) y porcentaje de explantes con hojas formadas (PH) (Cuadro 3). En ambas variables la mejor interacción correspondió a las plántulas con y sin sombra, con 100% de explantes

CUADRO 3. *Análisis estadístico de las variables: porcentaje de explantes con brotes de yemas y porcentaje de explantes con hojas formadas, a los 60 días de cultivo in vitro de segmentos nodales de guayabo (Psidium guajava L.). Experimento 1.*

Fuente de variación	Porcentaje de explantes con brotes de yemas		Porcentaje de explantes con hojas formadas	
	F	Pr > F	F	Pr > F
Condición de la planta madre (CPM)	10.76**	0.0001	15.78**	0.0001
Tiempo de cultivo (TC)	11.94**	0.0001	14.39**	0.0003
CPM * TC	28.30**	0.0001	22.25**	0.0001

NS: no significativo.

\*\*Significativo  $P < 0.01$ .

con brotes de yemas, y a los 20 días tenían hojas, indicando que la brotación ocurrió entre los 10 y 20 días (Cuadro 4). La segunda posición fue ocupada por plantas adultas bajo sombra, que inició la brotación de las yemas a partir de los 30 días (es decir, 10 días después que las plántulas) y la formación de hojas desde los 40 días.

En el PBV, las condiciones correspondientes a injertos adultos sobre patrones juveniles y plantas adultas a plena exposición solar no presentaron diferencias a los 50 y 60 días de cultivo, aunque sí a los 40 días, siendo la primera condición el tratamiento que alcanzó el mayor porcentaje (80%). Los explantes de plantas injertadas y adultas de campo a plena exposición solar tardaron un poco más en alcanzar su máximo valor de brotación (50 días), la cual se inició a partir de los 30 días, y la presencia de hojas 10 días después, al igual que en las plantas adultas con sombra.

En las plántulas, la alta y rápida respuesta de brotación y desarrollo de las hojas en los explantes se explica por su condición juvenil, que permite una fácil organogénesis debido a que se diferencian bioquímicamente de aquéllas con caracteres adultos en el bajo contenido de ácido abscísico y otros inhibidores, alto contenido de auxinas endógenas, alta actividad de peroxidasas en la base de las estacas y alta relación potasio/calcio (Caso, 1992). Amin y Jaiswal (1987) indicaron que la baja respuesta en plantas adultas puede ser atribuida a la ausencia de un período entre la implantación y adaptación a las condiciones in vitro.

En el tratamiento de plantas adultas bajo sombra se presume que la disminución de los niveles de irradiación solar recibidos por la planta madre (G. de García y Rafael, 1990; Marks y Simpsom, 1990; Sharma et al., 1995) durante períodos prolongados (Ramírez y León de S., 1997), pudieron ocasionar cambios anatómicos y bioquímicos que de alguna manera favorecieron o incrementaron la respuesta de brotación o

CUADRO 4. Efecto de la interacción entre la condición de la planta madre y el tiempo de cultivo en el porcentaje de explantes con brotes de yemas y porcentaje de explantes con hojas formadas en segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava L.*) cultivados *in vitro*.

Condición de la planta madre	Porcentaje de explantes con brotes de yemas Tiempo de cultivo (días)					Porcentaje de explantes con hojas formadas Tiempo de cultivo (días)				
	20	30	40	50	60	20	30	40	50	60
Injertos adultos/patronos juveniles	0 g <sup>1</sup>	40 ef	65 d	80 bc	85 b	0 f	0 f	60 d	75 cd	80 bc
Plántulas a plena exposición solar	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Plántulas bajo 40% de sombra	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Plantas adultas a plena exposición solar	0 g	30 f	50 e	70 cd	80 bc	0 f	0 f	45 e	65 d	75 cd
Plantas adultas bajo 80% de sombra	0 g	90 ab	100 a	100 a	100 a	0 f	0 f	90 ab	95 a	95 a

<sup>1</sup>Medias con letras distintas difieren significativamente ( $P < 0.05$ ).

reactivación de explantes provenientes de plantas adultas. Desde el punto de vista anatómico es factible que se haya incrementado el tejido parenquimatoso en la planta y a nivel bioquímico posiblemente ocurrieron cambios, como disminución en los contenidos de compuestos fenólicos y de la actividad de las polifenoloxidasas (Marks y Simpsom, 1990; Sharma et al., 1995), o bien, en la síntesis de determinados compuestos químicos que pudieron favorecer el incremento de la brotación de las yemas, tomando en consideración que la actividad de muchos sistemas enzimáticos es inducida por la luz (Marks y Simpsom, 1990). En regiones de tallo previamente ahiladas o blanqueadas se ha encontrado mayor cantidad de células parenquimatosas con menor estado de diferenciación y aumento en la acumulación de azúcares, auxinas naturales y otros cofactores, que en el caso de estacas, incrementan la formación de raíces (Herman y Hess, 1968).

Los resultados tienen relación con investigaciones de Amin y Jaiswal (1987), quienes señalaron que la brotación de los explantes de plantas adultas se dio entre la quinta y sexta semana de cultivo in vitro. Por su parte, Khattak et al. (1990) indicaron un 80% de explantes con yemas brotadas, procedentes de material vegetal adulto previamente sombreado, valor cercano al del tratamiento de plantas adultas bajo sombra. Sin embargo, muestran ciertas diferencias al compararlos con los registrados por Pírela y Mogollón (1996), quienes obtuvieron un 68.6% de brotación en explantes del cuarto nudo y 46.6% del tercer nudo, y a los de Loh y Rao (1989), quienes trabajaron con segmentos nodales de plántulas germinadas in vitro, que alcanzaron 100% de explantes con brotes y en plantas injertadas un 36.6% a las ocho semanas de cultivo. Este último valor contrasta con el obtenido en el tratamiento de plantas injertadas. Los valores registrados en plántulas, con o sin sombra, tienen relación con los mostrados por Mohamed et al. (1995), quienes lograron múltiples brotes por explante a las cuatro semanas de cultivo cuando utilizaron nudos de plántulas de guayabo germinadas in vitro.

En la Figura 1 se muestran los explantes procedentes de plántulas, con o sin sombra y de plantas injertadas y adultas, con o sin sombra, a los 60 días de cultivo. Puede observarse que los explantes de plántulas y plantas adultas sombreadas presentaron un desarrollo mayor de los brotes. Los explantes de plantas adultas injertadas sobre patrones juveniles y plantas adultas sin tratamiento mostraron características semejantes, aunque comparados con el resto de los tratamientos el desarrollo de los brotes tendió a ser más lento.

Los efectos individuales de los tratamientos efectuados a las plantas madres (TPM), el TC y la interacción entre los TPM y el TC mostraron diferencias significativas en el POS (Cuadro 5). El mejor tratamiento

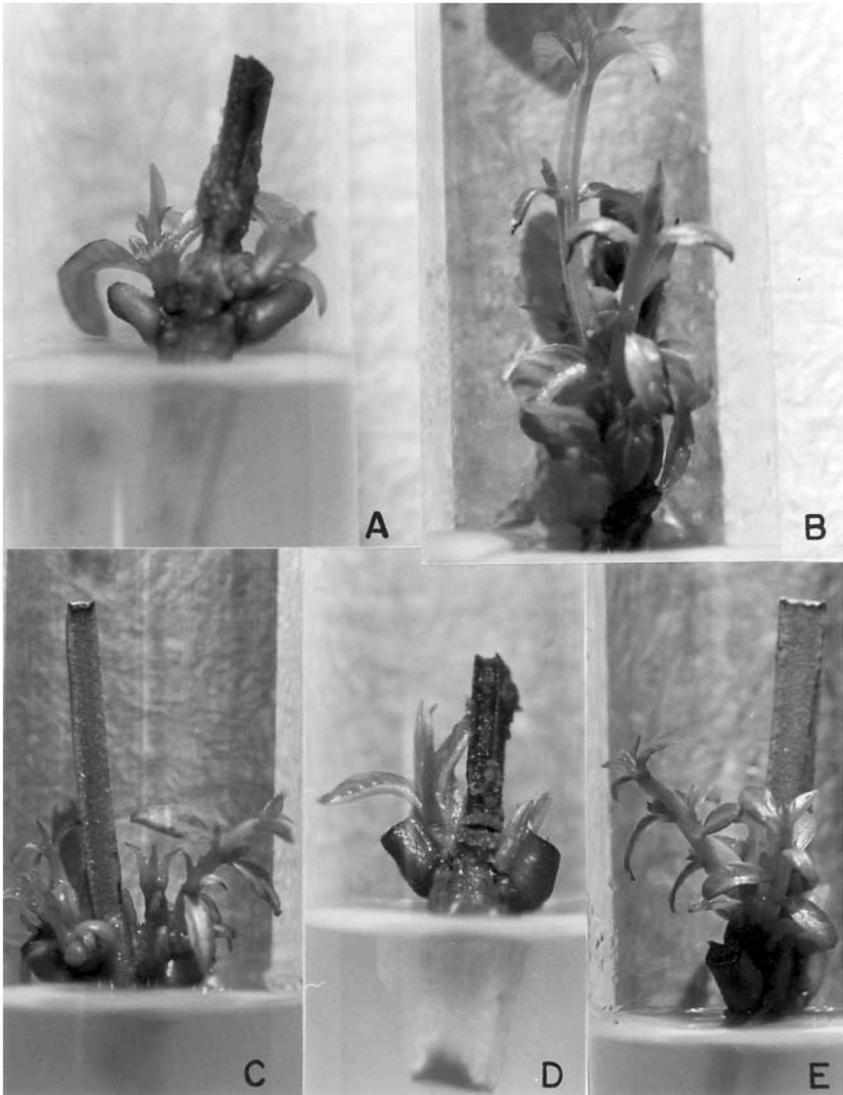


FIGURA 1. Segmentos nodales del guayabo (*Psidium guajava* L.) procedentes de: A) plantas injertadas, B) adulta sombreada, C) plántulas sombreadas, D) planta adulta sin tratamiento y E) plántulas a plena exposición solar, a los 60 días de cultivo. (Foto por Obdulio Ferrer.)

CUADRO 5. Análisis estadístico de las variables: porcentajes de explantes oscurecidos (POS), viables (PEV), con brotes de yemas (PBY) y con hojas formadas (PH), a los 60 días de cultivo in vitro de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.). Experimento 2.

Fuente de variación	%							
	POS		PEV		PBY		PH	
	F	Pr > F	F	Pr > F	F	Pr > F	F	Pr > F
Tratamiento a plantas madres (TPM)	7.04**	0.0010	19.26**	0.2759	26.75**	0.0001	26.01**	0.0001
Tiempo de cultivo (TC)	8.83**	0.0017	1.09 NS	0.3739	17.91**	0.0001	15.72**	0.0002
TPM * TC	9.79**	0.00726	0.56 NS	0.4482	13.76**	0.0012	9.29**	0.0005

NS: no significativo.

\*\*Significativo  $P < 0.01$ .

fue el de plantas bajo 80% de sombra, donde a 60 días de cultivo no hubo explantes oscurecidos (Cuadro 6). La poda parcial, aplicación de dormex (2% y 4%) y el control tuvieron un comportamiento similar en el POS, que osciló entre 50% y 60%. Estos valores son aceptables comparados con los encontrados por Parra et al. (1991) de 75% en guayabo y G. de García y Rafael (1990) de 98% en cacao.

El TC y la interacción entre los TPM y el TC no arrojaron diferencias significativas en el PEV, aunque los TPM sí manifestaron diferencias en esta variable (Cuadro 5). El 100% de los explantes obtenidos de plantas con 80% de sombra resultaron ser viables (Cuadro 7). Con los tratamientos restantes se obtuvo entre 80% y 95%. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Viloría (1993), Pírela y Mogollón (1996) y Ramírez et al. (1999b) en guayabo. El POS (0%) y el PEV (100%), obtenidos para las plantas bajo 80% de sombra (Cuadros 3 y 4), confirman que el sombreado prolongado en plantas madres adultas es favorable para disminuir el problema de oscurecimiento de los explantes e incrementar su viabilidad (Sharma et al., 1995; Ramírez y León de S., 1997).

Los TPM, el TC y la interacción entre los TPM y el TC presentaron diferencias para las variables PBY y PH (Cuadro 5). Desde los 30 días, 95% de los explantes de plantas sombreadas tenían brotes de yemas, el cual se incrementó a 100% después de los 40 días, no presentando diferencias a lo largo del período de evaluación (Cuadro 8). Las plantas con 2% y 4% de dormex ocuparon una segunda posición registrando 80% y 70%, respectivamente, a los 60 días de cultivo. La dosis de 4% de dormex, poda parcial y el control presentaron porcentajes de explantes con brotes de yemas similares. Al comparar 2% de dormex con el control se

CUADRO 6. *Efecto de la interacción entre tratamientos a plantas madres adultas y el tiempo de cultivo en el porcentaje de explantes oscurecidos de segmentos nodales de guayabo (Psidium guajava L.).*

Tratamiento a plantas madres	Porcentaje de explantes oscurecidos Tiempo de cultivo (días)			
	30	40	50	60
Control	10 de <sup>1</sup>	10 de	35 c	50 abc
2% dormex <sup>2</sup>	5 de	5 de	40 c	50 abc
4% dormex	15 d	15 d	40 c	60 a
Poda parcial	5 de	5 de	45 bc	55 ab
80% sombra	0 e	0 e	0 e	0 e

<sup>1</sup>Medias con letras distintas difieren significativamente (P < 0.05).

<sup>2</sup>Dormex: cianamida hidrogenada 49%.

CUADRO 7. *Efecto de tratamientos a plantas madres adultas en el porcentaje de explantes viables de segmentos nodales de guayabo (Psidium guajava L.), a los 60 días de cultivo in vitro.*

Tratamiento a plantas madres	Porcentaje de explantes viables
Control	80 b <sup>1</sup>
2% dormex <sup>2</sup>	95 ab
4% dormex	80 b
Poda parcial	80 b
80% sombra	100 a

<sup>1</sup>Medias con letras distintas difieren significativamente ( $P < 0.05$ ).

<sup>2</sup>Dormex: cianamida hidrogenada 49%.

encontró que este tratamiento incrementó significativamente los PBY y PH. En el campo este producto induce el brote de yemas en las plantas (Quijada, 1997). Los resultados sugieren la aplicación del producto en las plantas madres para aumentar y adelantar el brote de yemas en los explantes. Los brotes vegetativos se deben recolectar una o dos semanas después de la aplicación, ya que con el tiempo disminuye la acción del producto.

El efecto de la cianamida hidrogenada en el brote de las yemas ha sido asociado al aumento de la tasa respiratoria de los tejidos, lo que determina la brotación de las yemas (Ruiz, 1984; Shulman et al., 1983). El comportamiento bioquímico y fisiológico de la cianamida ha sido explicado por Ruiz (1984), quien señaló su influencia en el metabolismo de la planta a través del sistema respiratorio, siendo completamente descompuesta a urea y explotada como fuente de nitrógeno. El proceso

CUADRO 8. *Efecto de la interacción entre los tratamientos a la planta madre y el tiempo de cultivo en el porcentaje de explantes con brotes de yemas y porcentaje de explantes con hojas formadas en segmentos nodales de guayabo (Psidium guajava L.) cultivados in vitro.*

Tratamientos a la planta madre	Porcentaje de explantes con brotes de yemas				Porcentaje de explantes con hojas formadas			
	Tiempo de cultivo (días)				Tiempo de cultivo (días)			
	30	40	50	60	30	40	50	60
Control	25 g <sup>1</sup>	30 fg	45 e	65 c	0 g	25 f	40 e	60 cd
2% Dormex <sup>2</sup>	40 ef	50 de	65 c	80 b	0 g	50 de	65 bc	75 b
4% Dormex	20 g	30 fg	60 cd	70 bc	0 g	25 f	50 de	65 bc
Poda parcial	20 g	30 fg	50 de	65 c	0 g	20 f	45 e	65 bc
80% sombreadamiento	95 a	100 a	100 a	100 a	0 g	95 a	100 a	100 a

<sup>1</sup>Medias con letras distintas difieren significativamente ( $P < 0.05$ ).

<sup>2</sup>Dormex: Cianamida hidrogenada 49%.

se inicia con la absorción del producto a través de los órganos de las plantas, translocándose desde la raíz a las hojas y viceversa.

El PH fue significativamente mayor con el tratamiento de sombra. El 100% de los explantes formaron hojas sobrepasando el obtenido por Khattak et al. (1990), quienes reportaron un 80%; Pírela y Mogollón (1996), un 68.8%; y Loh y Rao (1989), un 36.6%. El tratamiento de plantas con sombra presentó el mayor valor desde los 40 días de cultivo, seguido de 2% de dormex desde los 50 días, y 4% de dormex y poda parcial a los 60 días.

En todos los tratamientos realizados a la planta madre se encontró que el brote de yemas se inició a los 30 días de cultivo y la formación de hojas a los 40 días (Cuadro 8). En el guayabo se han reportado brotes en los explantes a la quinta y sexta semana (Amin y Jaiswal, 1987), sexta y octava semana (Amin y Jaiswal, 1988) y a la segunda semana (Pírela y Mogollón, 1996). Estas diferencias tan marcadas posiblemente se deban, entre otras causas, a la procedencia del material vegetal seleccionado, condiciones de crecimiento y al protocolo de desinfección superficial utilizado.

### CONCLUSIONES

El establecimiento *in vitro* de segmentos nodales del guayabo fue exitoso al emplear material vegetal procedente de plantas de injertos adultos sobre patrones juveniles, plántulas y plantas adultas con o sin sombra. Los explantes de plantas de injertos adultos sobre patrones juveniles, plántulas y plantas adultas cultivadas en el campo con y sin sombra presentaron altos porcentajes de explantes viables (90% a 100%). Los explantes procedentes de plantas madres adultas cultivadas en el campo a plena exposición solar presentaron un comportamiento similar a los de injertos adultos sobre patrones juveniles en los porcentajes de explantes viables, oscurecidos, con yemas brotadas y con hojas formadas.

El tratamiento de sombreado de la planta madre adulta permitió obtener una mejor respuesta en la brotación y desarrollo de los brotes, y un menor oscurecimiento de los explantes después de los 40 días de cultivo. Los explantes procedentes de plantas madres adultas con poda parcial y aplicación de 4% de dormex presentaron un comportamiento similar a los de plantas sin tratamiento en los porcentajes de explantes oscurecidos, viables, con brotes de yemas y con hojas formadas, a los 60 días de cultivo *in vitro*.

Las plántulas con y sin sombra mostraron una rápida respuesta de brotación de las yemas y desarrollo de los brotes (100%), a los 20 días de cultivo *in vitro*. En los segmentos nodales de injertos adultos sobre

patrones juveniles y plantas adultas de guayabo con o sin sombra se dio a partir de los 30 días y la presencia de hojas a los 40 días.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se recomienda considerar la utilización de porciones de malla para cubrir los brotes por períodos de tiempo mayores a los 15 días. Además, se debe evaluar el número de brotes de yemas y número de brotes por explante y la longitud de los brotes durante la etapa de establecimiento.

#### LITERATURA CITADA

- Amin, M. y V. Jaiswal, 1987. Rapid clonal propagation through in vitro shoot proliferation on nodal explants of mature trees. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 9:235-243.
- Amin, M. y V. Jaiswal, 1988. Micropropagation as an aid to rapid cloning of guava cultivar. *Scientia Hort.* 36:89-95.
- Araujo, F., S. Quintero, J. Salas, J. Villalobos y A. Casanova, 1997. Crecimiento y acumulación de nutrientes del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.) del tipo "Criolla roja" en la planicie de Maracaibo. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 14:315-328.
- Avilan, L., F. Leal y D. Bautista, 1992. Manual de Fruticultura. Principios y manejo de la producción. Segunda Edición. Tomo II. Editorial América C. A. Caracas, Venezuela. pp. 777-1472.
- Caso, O., 1992. Juvenilidad, rejuvenecimiento y propagación vegetativa de las especies leñosas. *Agriscientia* 9:5-16.
- G. de García, E. y M. Rafael, 1990. Control de la oxidación y contaminación en microesquejes de café (*Coffea arabica* 'Catimor') cultivados 'in vitro'. *Agron. Trop.* 40:281-290.
- Giladi, I., A. Altman y R. Goren, 1979. A method for aseptic culture of bud explants from citrus trees. *Scientia Hort.* 10:357-362.
- Hartmann, H. T. y D. E. Kester, 1992. Propagación de plantas. Principios y prácticas. Trad. A. M. Ambrosio. Segunda edición. Compañía Editorial Continental, S. A. De C. V. México. 760 pp.
- Herman, D. E. y C. E. Hess, 1968. The effect of etiolation upon rooting of cuttings. *Proc. Inter. Plant Propagation Soc.* 13:46-62.
- Khattak, M., M. Malik y M. Khan, 1990. Effect of surface sterilization agents on in vitro culture of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Sufeda tissue. *Sarhad J. Agric.* 6:151-154.
- Loh, C. y A. Rao, 1989. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from seedlings and grafted plants and adventitious shoot formation in vitro. *Scientia Hort.* 39:31-39.
- Marks, T. R. y S. E. Simpsom, 1990. Reduced phenolic oxidation at culture initiation in vitro following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. *J. Hort. Sci.* 65:103-111.
- Mohamed, Y., S. A. Barringer, R. J. Schnell y W. E. Splittstoesser, 1995. In vitro shoot proliferation and propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from germinated seedlings. *Plant Cell Reports* 14:525-528.
- Murashige, T. y F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Phys. Plant.* 15:473-493.
- Papadatau, P., C. A. Pontikis, E. Ephtimiadou y M. Lydaki, 1990. Rapid multiplication of guava seedlings by in vitro shoot tip culture. *Scientia Hort.* 45:99-103.
- Parra, G., J. Pérez y Z. Viloría, 1991. Una metodología para el control de contaminantes y ennegrecimiento en diferentes tipos de explantas de *Psidium guajava* L. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 8:238.

- Pérez P., M. A., M. E. González B. y C. Pérez, 1994. Micropropagation of *Fraxinus angustifolia* from mature and juvenile plant material. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 37:297-302.
- Pirela, M. y N. Mogollón, 1996. In vitro clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Mara-7 from stem shoots of cv. Mara-7. *Acta Horticulturae* 452:47-52.
- Quijada, O., 1997. Efecto de la poda y la cianamida hidrogenada sobre la fructificación, producción y calidad del guayabo (*Psidium guajava* L.) en el mcpio. Mara, del edo. Zulia. Trabajo de grado. La Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. Maracaibo, Venezuela. 61 p.
- Ramírez, M., 1998. Tratamientos a plantas madres y al explante para el establecimiento in vitro del guayabo (*Psidium guajava* L.). Trabajo de grado. Maracaibo: La Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. División de Estudios para Graduados. Programa de Fruticultura. 132 p.
- Ramírez, M., R. Santos y F. Isea, 2000. Hongos contaminantes durante el establecimiento in vitro del guayabo (*Psidium guajava* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 17:217-225.
- Ramírez, M. y S. León de S., 1997. Efecto del sombreado sobre el oscurecimiento in vitro de segmentos nodales de *Psidium guajava* L. *Revista Científica UNET* 9:80.
- Ramírez, M., A. Urdaneta y M. Marín, 1999a. Injertación y estaquillado en el guayabo bajo condiciones de bosque muy seco tropical. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 16:36-42.
- Ramírez, M., S. León de S. y A. Urdaneta, 1999b. Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento in vitro de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Nierdz. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 16:243-255.
- Rey, H. Y., O. J. Burtnik, P. A. Sansberro y L. A. Mroginski, 1991. Medios de cultivo para el establecimiento in vitro de explantos de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *Turrialba* 41:306-310.
- Roca, W., 1992. Aplicaciones de los métodos de cultivo de tejidos en frutales. *En:* 91-93 p. Fruticultura Tropical Federación Nacional de Cafeteros de Colombia - Programa de Desarrollo y Diversificación de Zonas Cafeteras. Tercera Edición. Litografía Atlas. Colombia.
- Ruiz, G., 1984. El uso de la cianamida hidrogenada ( $H_2CN_2$ ) en el rompimiento del reposo en yemas y su influencia en la producción de vid (*Vitis vinifera* L). Universidad de Sonora. Departamento de Horticultura. Sonora. pp. 7-8.
- SAS, Institute, Inc., 1987. SAS user's guide version 6: Statistics. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Sharma, H., R. Sharma y A. Goswami, 1995. Effect of etiolation on polyphenol oxidase activity in shoots of grape and its subsequent in vitro survival. *Indian J. Hort.* 52:104-107.
- Shulman, Y., G. Nir, L. Fanberstein y S. Lavee, 1983. The effect of cyanamide on the release from dormancy of grapevine buds. *Scientia Hort.* 19:97-104.
- Soubihe, J. y J. Gurdel, 1962. Taxa de panmixia na goiabeira. *Bragantia* (Brazil) 21:15-20.
- Tong, O. y K. Khay, 1990. Guava in Malaysia. Production, pests and diseases. First edition. Tropical Press SDN. BHD. Malaysia. 261 p.
- Vieitez, A., M. Sánchez, J. Amo y A. Ballester, 1994. Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 37:287-295.
- Viloria, Z., 1993. Cultivo in vitro de nudos de guayabo (*Psidium guajava* L). Fase I. Trabajo de Ascenso. La Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. Maracaibo, Venezuela. 35 p.

