

## Efecto de la exposición solar de las plantas donantes en la iniciación del cultivo *in vitro* de guayabo (*Psidium guajava* L.).<sup>1</sup>

Effect of stock plant solar exposure on the *in vitro* culture initiation of guava (*Psidium guajava* L.)

Silvia León de Sierralta<sup>2</sup>  
Lilia Arenas de Moreno<sup>3</sup>  
Zenaida Viloria<sup>4</sup>

### Resumen

Con el objeto de eliminar el ennegrecimiento de los tejidos producido por oxidación fenólica cuando se inicia su cultivo *in vitro*, se investigó el efecto de la protección de la planta donante a la exposición de la luz solar en la supervivencia de meristemos apicales y yemas axilares de guayabo. La supervivencia de las explantas estuvo afectada por la exposición de las plantas donantes a la irradiación solar, observándose mayor supervivencia en las protegidas. Estas diferencias fueron significativas ( $P < .10$ ) entre los meristemos apicales. La protección solar también resultó en una reducción del contenido de fenoles preexistentes en las explantas ( $P < .01$ ). Se considera la posibilidad de que existe una relación entre el contenido de compuestos fenólicos preexistentes en los meristemos apicales y la supervivencia de los mismos aún y cuando no hay diferencia significativa. Por ahora no se puede establecer esta posibilidad para las yemas, debido a que éstas presentaron mayor supervivencia que los ápices con un mayor contenido de fenoles, respuesta, que pudiera estar asociada con el tamaño y tipo de explanta. Se recomienda continuar con estudios de pretratamientos de plantas donantes, evaluar protección solar más prolongada y utilizar explantas crecidas bajo sombra natural.

**Palabras claves:** *Psidium guajava*, establecimiento de explantas, supervivencia de explantas, fenoles totales, ennegrecimiento.

---

Recibido el 22-07-94 • Aceptado el 23-10-96

1. Proyecto No 0174-93 financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de La Universidad de Zulia (CONDES).

2. Departamento de Química. Facultad de Agronomía. (LUZ). Apartado 15205 Maracaibo, ZU 4005, Venezuela.

3. Instituto de Investigaciones Agronómicas Facultad de Agronomía. (LUZ).

4. Departamento de Botánica. Facultad de Agronomía. (LUZ).

## Abstract

In order to eliminate tissue browning produced by phenolic oxidation when the *in vitro* culture is initiated, the effect of solar exposure protection of the stock plant on guava shoot tip and bud survival was evaluated. Survival of the explants was affected by solar exposure of the stock plants being greater for those protected ones. These differences ( $P < .01$ ) were between shoot tips. Solar protection also resulted in a lower preexisting phenolic content ( $P < .01$ ). The possibility of a relationship between preexisting phenols of the shoot tips and their survival is considered, even though there was no statistical difference. This difference was not observed in buds as these had greater survival with a higher phenol content, such behavior could be due to the explant chosen and its size. We recommend to continue further studies on pretreatment of stock plants, evaluate longer solar protection and use naturally shaded explants.

**Key words:** *Psidium guajava*, explant establishment, explant survival, total phenols, browning.

## Introducción

El inicio del cultivo *in vitro* es una etapa crítica y determinante del éxito de la técnica de micropropagación para cualquier especie de planta.

Se ha reportado la propagación *in vitro* de algunas variedades de guayabo a partir de partes de plántulas (10, 15) y también a partir de tejido adulto utilizando segmentos nodales (1, 2, 8, 10).

Sin embargo, la regeneración de estas plantas al utilizar material adulto, al igual que ocurre con un gran número de especies leñosas, aún presenta problemas, principalmente durante la etapa de iniciación (2, 4, 6, 8, 11).

Frecuentemente el establecimiento del cultivo *in vitro* de tejidos procedentes de plantas leñosas se ve impedido por la aparición de ennegrecimiento y necrosis de los tejidos (6, 11, 19).

Al cortar, se exudan compuestos

fenólicos de los tejidos de las plantas que luego se oxidan ennegreciendo el medio y afectando el crecimiento y supervivencia de los mismos (6, 9, 11).

Se han utilizado varios métodos con el fin de disminuir este problema. Entre ellos se menciona el pretratamiento de explantas con antioxidantes (9, 14), la incorporación de antioxidantes (9) o carbón activado (4) al medio nutritivo, el subcultivo frecuente en medio fresco (3), la inmersión en agua destilada estéril algunas horas antes de la siembra *in vitro* (17) y la modificación de las condiciones ambientales *in vitro* al iniciar los cultivos en oscuridad (12) o a bajas temperaturas (9) lo cual ha disminuido el ennegrecimiento de explantas.

Sin embargo, el éxito de estas técnicas ha sido limitado, ya que en vista de que se aplican *in vitro*, generalmente afectan las condiciones

óptimas para el crecimiento de las explantas (7, 11).

Recientemente se ha enfatizado la importancia del tratamiento del material donante (6, 16) y el efecto del origen del mismo (7, 19) como medio para controlar el ennegrecimiento oxidativo y sus consecuencias en la supervivencia de las explantas al momento de establecerlas *in vitro*.

Marks y Simpson (11) demostraron que el mecanismo de oxidación fenólica e inhibición del crecimiento *in vitro* en plantas leñosas puede ser controlado por el nivel de irradiación de las plantas donantes cultivadas en

el campo sin necesidad de incorporar procedimientos potencialmente inhibidores del crecimiento *in vitro*, basándose en el metabolismo de los fenómenos donde existen procesos inducidos por la luz, tales como la actividad de sistemas enzimáticos involucrados en la síntesis y oxidación de estos compuestos.

El propósito de este estudio fue determinar el efecto de la protección de la planta donante a la exposición de la luz solar en la supervivencia de las explantas, al controlar el ennegrecimiento durante el inicio del cultivo de ápices y yemas de guayabo *in vitro*.

## Materiales y métodos

**Material vegetal.** Se seleccionaron al azar diez plantas de guayabo, tipo colorada, de año y medio de edad, ocho meses de transplantadas, altura promedio de 90 cm y una copa de 45 cm. Cinco se protegieron del sol. Estas plantas pertenecen al huerto de la finca La Cocuiza ubicada en el Municipio Mara del Estado Zulia.

**Tratamiento de campo.** Para proteger las plantas del sol, se construyeron estructuras cilíndricas con malla metálica, se forraron con papel, se cubrieron con bolsas negras de polietileno y se colocaron sobre las plantas durante ocho días.

**Iniciación del cultivo.** Se cortaron diez puntas de brotes de aproximadamente ocho cm de largo de cada planta sombreada, lo que hizo un total de cincuenta, de las cuales se separaron 50 meristemos apicales y 50 yemas. Lo mismo se hizo con las plantas expuestas al sol.

Las explantas se mantuvieron en agua hasta su desinfección. La desinfección del material consistió en un lavado con agua jabonosa, enjuague, inmersión en solución de Benomyl (1 g/L) y Rifampicina (100 mg/L) durante 5 minutos, después de los cuales se colocaron en solución con cloro comercial (hipoclorito de sodio al 7.5 %) durante quince minutos. Finalmente se lavó tres veces con agua bidestilada esterilizada. Los ápices se cortaron hasta un tamaño promedio de 2 mm, el tamaño de las yemas osciló entre 2 y 4 mm. Todas las explantas se colocaron en frascos de vidrio con tapa de rosca que contenían 20 mL de medio nutritivo.

### Cultivo *in vitro*

**Medio nutritivo.** Se utilizó el medio de Murashige y Skoog (12), forma líquida, suplementado con 0.1 mg/L de benciladenina durante seis días y luego el mismo medio solidi-

ficado con agar al 0.6 %. El pH se ajustó a 5.8 antes de esterilizar.

**Condiciones de crecimiento.** Las explantas se mantuvieron a 25-26° C con un fotoperiodo de 12 horas y una intensidad luminosa de 3000 Lux.

**Estimación de fenoles.** De cada grupo de planta (expuesta y no expuesta a la luz) se tomaron seis puntas de brotes. Seguidamente se separaron ápices y yemas. Con estas muestras se procedió a la extracción y determinación de los compuestos fenólicos utilizando el método descrito por Wilson y Blunden (15) quienes utilizaron el reactivo de Folin-Denis y ácido tánico como patrón para determinar fenoles en yemas de pera.

**Análisis estadístico.** Se utilizó un diseño de bloques al azar con cinco repeticiones y dos factores en estudio: la exposición solar y dos tipos de explantas (cuatro tratamientos). Se midieron las variables supervivencia de explantas y concentración de los fenoles preexistentes en las explantas. La unidad experimental estuvo constituida por diez explantas. Se realizó un análisis de varianza para las variables supervivencia y concentración de fenoles cuyos valores fueron previamente transformados por las ecuaciones  $\sqrt{y} + 0.5$  y  $\sqrt{y}$  respectivamente. El análisis de los resultados se realizó utilizando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS.

## Resultados

La supervivencia de las explantas estuvo afectada por la exposición de las plantas donantes a la irradiación solar (cuadro 1), observándose una mayor supervivencia de las explantas provenientes de las plantas protegidas. Estas diferencias fueron significativas ( $P < .10$ ) entre los meristemos apicales.

La supervivencia de las explantas

difirió marcadamente ( $P < .01$ ) con el tipo de explanta utilizado, ya que se observó mayor supervivencia de las yemas con respecto a los meristemos apicales para cada una de las condiciones de las plantas donantes.

Al igual que para la variable supervivencia se observó efecto de la exposición a la luz en el contenido de

**Cuadro 1. Efecto de la exposición a la luz sobre la supervivencia de explantas de guayabo, seis días después de cultivadas *in vitro*.**

Tipo de explanta	Exposición a la luz	
	Protegidas	Expuestas
Yema	8.0 <sup>a</sup> (80)	6.4 <sup>ab</sup> (64)
Meristemo apical	4.4 <sup>b</sup> (44)	1.0 <sup>c</sup> (10)
C.V. = 16.17 %	Rango de variación: 0.0 a 9.0	

a, b, c: Medias con letras diferentes, presentan diferencias significativas ( $P < .10$ ) al número original de explantas ( $n = 10$  para cada tratamiento).

**Cuadro 2. Efecto de la exposición de las plantas donantes sobre el contenido de ácido tánico (mg/100 mg de materia seca) de dos explantas de guayabo.**

	Exposición a la luz	
	Protegidas	Expuestas
	10.69 <sup>a</sup>	16.16 <sup>b</sup>
C.V. = 10.85 %	Rango de variación: 4.74 a 27.65	

a, b: Medias con letras diferentes, presentan diferencias significativas ( $P < .01$ ).

fenoles totales (cuadro 2). Así vemos que, en las explantas expuestas al sol, el contenido de compuestos fenólicos fue mayor que en las protegidas ( $P < .01$ ).

Sin embargo, cuando comparamos la explanta en forma individual, a pesar de que se observa una disminución en el contenido de los com-

puestos fenólicos preexistentes en las protegidas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (cuadro 3). Solo se encontraron diferencias significativas entre ápices y yemas tomados de plantas donantes expuestas al sol, siendo mayor en las yemas ( $P < .05$ ).

## Discusión

Se demostró que la oxidación fenólica es un problema para la iniciación de las explantas de guayabo *in vitro* cuando se trabaja con mate-

rial procedente del campo. Esta observación es consistente con lo reportado por algunos autores cuando mencionan métodos para disminuir o

**Cuadro 3. Contenido de ácido tánico en explantas de guayabo protegidas y expuestas a la luz.**

Tipo de explanta	Contenido de ácido tánico (mg/100 mg MS)	
	Exposición a la luz	
	Protegidas	Expuestas
Meristemo apical	6.57 <sup>b</sup>	12.98 <sup>b</sup>
Yema	13.47 <sup>ab</sup>	19.34 <sup>a</sup>
C.V. = 10.85%	Rango de variación: 4.74 a 27.65	

a, b: Medias con letras diferentes, presentan diferencias significativas ( $P < .10$ ) al número original de explantas ( $n = 10$  para cada tratamiento).

eliminar el ennegrecimiento de material de guayabo proveniente del campo (2, 6) mientras otros reportan resultados muy halagadores utilizando material procedente de plántulas obtenidas *in vitro* (10). En otras especies se ha reportado mayor supervivencia del material procedente de invernadero al compararlo con el del campo (7).

Se obtuvo mayor supervivencia de los meristemos apicales provenientes del material crecido bajo sombra. Yu y Meredith (16) encontraron una mayor supervivencia de los meristemos apicales de vid provenientes de material crecido en la sombra con respecto al que estaba expuesto a pleno sol, así mismo, observaron una correlación negativa entre la supervivencia *in vitro* y el contenido de fenoles preexistente en las explantas y por tanto sugirieron que la respuesta al cultivo *in vitro* estaba afectada en parte por los niveles de compuestos fenólicos presentes en el material. En este ensayo el contenido de compuestos fenólicos fue menor en los meristemos apicales tomados de plantas protegidas, pero tal disminución no fue significativa; ésto pudiera sugerir mayor tiempo de protección a la exposición solar. Se considera la posibilidad de que existe una relación entre el contenido de compuestos fenólicos preexistentes en los ápices y la supervivencia de los mismos aún cuando no hay diferencia significativa. Por ahora no se puede establecer esta

posibilidad para yemas, debido a que estas presentaron mayor supervivencia que los ápices a pesar de que la concentración de fenoles fue más alta, comportamiento que pudiera estar asociado con el tipo de explanta y el tamaño de las mismas (5).

Marks y Simpson (11) demostraron que el mecanismo de la oxidación fenólica y de la inhibición del crecimiento en plantas leñosas puede ser controlado por los niveles de irradiación recibidos por las plantas donantes, basando sus estudios en el metabolismo de fenoles ya que la actividad de muchos sistemas enzimáticos que participan en la síntesis y oxidación de los mismos es inducida por la luz.

Este trabajo constituye un avance para demostrar que el ennegrecimiento de explantas provenientes de material adulto de guayabo puede ser disminuido al controlar los niveles de irradiación solar que reciben las plantas donantes, sin necesidad de recurrir a tratamientos *in vitro* que puedan afectar la viabilidad de las explantas. Se piensa que al continuar con estudios de pretratamiento de plantas donantes y del contenido de compuestos fenólicos en diferentes explantas se puede aumentar la eficiencia de la regeneración *in vitro*. También se puede considerar la posibilidad de escoger el material sombreado en condiciones naturales y evaluar su comportamiento *in vitro*.

## Agradecimiento

Agradecemos al Ing. Agr. Pedro Corzo por facilitar el material vegetal producido en sus granjas y al Ing. Agr. Luis Sandoval por el análisis estadís-

tico de los datos. Igualmente agradecemos al Técnico Miguel Molina por su colaboración en las tareas de laboratorio.

## Literatura citada

1. Amin, M. N. and V. S. Jaiswal, 1987. Rapid clonal propagation of guava through *in vitro* shoot proliferation on nodal explants of mature trees. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 9: 235-243.
2. Broodrijk, M. 1990. New sterilization method for the *in vitro* culture of guavas (*Psidium guajava* L.). *Horticultural Abstr.* 60: 7.
3. Broome, O. C. and R. H. Zimmerman. 1978. *in vitro* propagation of blackberry. *HortScience.* 13: 151-153.
4. Claudebon, M., M. Gendraud and A. Francllet. 1988. Roles of phenolic compounds on micropropagation of juvenile and mature clones of *Sequoiadendron giganteum*: Influence of Activated Charcoal. *Scientia Hort.* 34: 283-291.
5. Conger, B. V. 1981. Introduction, p.14-15. In: B. V. Conger (ed.) *Cloning agricultural plants via in vitro techniques*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
6. Dalal, M. A., B. B. Sharma, and M. Srinivasa Rao. 1992. Studies on stock plant treatment and initiation culture mode in control of oxidative browning in *in vitro* cultures of grapevine. *Scientia Hort.* 51: 35-41.
7. Fanizza, G., O. A. Tanzarella and G. Carrozzo. 1984. Influence of Vitis source on *in vitro* shoot apex culture. *Ann. Applied Biol.* 104: 577-578.
8. Fitchet, M. 1990. Tissue culture of guava. *Horticultural Abstr.* 60(2): 1500.
9. Hildebrandt, V. and P. M. Harney. 1988. Factors affecting the release of fenolic exudate from explants of *Pelargonium x hortorum*, Bailey Springer Scarlet. *J. Hort. Sci.* 63: 651-657.
10. Loh, C. S. and A. N. 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.
11. Marks, T. R. and S. E. Simpson. 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(2): 103-111.
12. Meyer, Jr., M. M. 1984. A new method for propagating woody plants from tissue culture. *The Azalea.* 6: 13-15.
13. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
14. Murashige, T. 1974. Plant Propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135-166.
15. Papadatou, P., C. A. Pontikis, E. Ephtimiadou, and M. Lydaki. 1990. Rapid multiplication of guava seedlings by *in vitro* shoot tip culture. *Scientia Hort.* 45: 99-103.
16. Read, P. and A. Economou. 1987. Stock plant influence on tissue culture success. *Acta Hort.* 212: 111.
17. Vieitez, A. M. and E. Vieitez. 1980. Plantlet formation from embryonic tissue of chestnut grown *in vitro*. *Physiol. Plant.* 50: 127-130.
18. Wilson, M. F. and C. A. Blunden. 1983. Changes in the levels of polyphenols in three pear varieties during bud development. *J. Sci. Food Agric.* 34: 973-978.
19. Yu, D. and C. P. Meredith. 1986. The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 11(6): 972-975.