

## Método de desinfección y efecto de citocininas en el cultivo *in vitro* de segmentos de hojas de *Psidium guajava* L.<sup>1</sup>

Desinfection method and cytokinine effect on the *Psidium guajava* L. leaf segments *in vitro* culture

M. del C. Ramírez Villalobos<sup>2</sup> y E. G. Salazar Yamarte<sup>3</sup>

### Resumen

Con el objetivo de establecer *in vitro* segmentos de hojas de *Psidium guajava* L. se evaluaron métodos de desinfección superficial y las citocininas: benciladenina (BA), 2-isopentiladenina (2ip), zeatina (ZEA), ribozeatina (RZEA) y kinetina (KIN) a tres niveles de concentración. El diseño estadístico fue totalmente al azar con 5 repeticiones y 5 explantes como unidad experimental. Los resultados indican que el establecimiento aséptico de los explantes se logró con un enjuague previo de las hojas por 30 min en agua jabonosa, 30 min en benomil ( $14 \text{ g L}^{-1}$ ), más rifampicina ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ), 1 min en alcohol etílico al 70 % y 15 min en hipoclorito de calcio al 10% (p/v). El porcentaje de explantes oscurecidos tendió a incrementarse a partir de los 16 días. El porcentaje de explantes viables fue muy bajo a los 32 días de la siembra, lo cual se asoció al oscurecimiento de los explantes. La formación de callo se manifestó a los 16 días y el mayor porcentaje se produjo con los tratamientos  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de 2ip (68%),  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de 2ip (76%) y  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de ZEA (80%), no existiendo diferencias significativas entre estos. La mayoría de las citocininas provocaron en los explantes una tendencia a doblarse hacia la cara que estaba en contacto con el medio de cultivo, a excepción de 2ip que ocasionó deformación en los cortes del explante con alta proliferación de callo. No se observó formación de estructuras, aunque sí de callo, indicando la posibilidad de desarrollo de primordios foliares y de hojas, si se mejorara el problema de oscurecimiento de los tejidos.

**Palabras claves:** Desinfección superficial, citocininas, formación de callo, *Psidium guajava*.

Recibido el 01-04-1997 • Aceptado el 16-01-1998

1. Proyecto financiado por CONDES N° 1037-94, CONICIT SI-2378 / SI-2808, CENIAP.

2. Posgrado de Fruticultura. Facultad de Agronomía. La Universidad del Zulia (LUZ). Apartado 15205. Maracaibo, Zulia 4005. Venezuela. Fax: 58 61 596183.

3. Departamento de Biotecnología. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). Apartado 4653. Maracay 2101. Aragua, Venezuela.

## Abstract

In order to establish *Psidium guajava* leaf segments *in vitro*, disinfection methods and cytokinines: Bencyladenine (BA), 2-isopenteniladenine (2ip), zeatyne (ZEA), ribozeatyne (RZEA) and kynetine (KIN) were evaluated at three concentration levels. The total randomized statistical design with five replications and five explants as experimental units. The results indicate that explants aseptic establishment is reached with a prior rinse of the leaves during 30 min in soap water, 30 min in benomyl ( $14 \text{ g L}^{-1}$ ) plus rifampycine ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ), 1 min in ethylic alcohol 70% and 15 min in calcium hypochlorite 10% (p/v). The darkened explants percentage extended to increase starting at 16 days. The viability explants percentage was very low 32 days after sowing which was associated to explants darkening. The callus formation was demonstrated at 16 days and the highest percentage was produced with  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  2ip (68%),  $10 \text{ mg L}^{-1}$  2ip (76%) and  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  ZEA (80%) treatments there were not significant differences among them. The most cytokinines provoked in the explants a trend to fold toward, which was touching the culture medium, the only exception was 2ip that caused a deformation in explant cuts with high callus proliferation. Structure formation was not observed although there was callus formation. This indicates the possibility of development of leaf primordia and leaves if the browning of the tissues is solved.

**Keys words:** surface sterilization, leaf segments, cytokinines, callus formation, *Psidium guajava*.

## Introducción

El guayabo (*Psidium guajava* L.) se encuentra cultivado en más de 15 países en todo el mundo, donde la mayor producción de guayaba está en la India, Brasil y México, seguido de Sudafrica, Jamaica, Kenya, Cuba, República Dominicana, Venezuela, Puerto Rico, Haití, Guyana, Colombia, USA (Hawai y Florida), Taiwan, Egipto y Filipinas (17). Esta especie presenta gran importancia debido a su notable expansión y a las características del fruto, ganando gran aceptación en los mercados internacionales. Por tal motivo, a nivel de los principales países productores se ha estudiado el uso de la micropropaga-

ción *in vitro* e inducción de callo con miras a la regeneración de plantas con características agronómicas deseadas. La propagación de esta especie por cultivo *in vitro* constituye un método que podría asegurar la producción masiva de plantas genotípicamente iguales a la planta madre, en un tiempo relativamente corto, una vez logrado su protocolo de regeneración.

En guayabo, son muy pocos los trabajos relacionados con el cultivo *in vitro* de segmentos de hojas, aunque, Loh y Rao (8) señalan la formación de protuberancias o brotes en hojas de plántulas de 5 a 7 semanas de germinadas *in vitro*. La potencialidad de

desarrollo de plantas a partir de primordios foliares y de hojas ha sido demostrada por Furelli y C. de García (4), los cuales reseñan haber obtenido plántulas de secciones de hojas del helecho *Pteris cretica* "Win Setti". En plantas leñosas, ha sido utilizado con cierto éxito, en brotes de árboles adultos de manzano (19). En semileñosas,

hojas de maracuya amarillo han mostrado resultados sobresalientes en la brotación de callos friables y en la formación de brotes y raíces a partir de callos (1). El objetivo de este trabajo fue lograr las condiciones asépticas y evaluar el efecto de varias citocininas durante el establecimiento *in vitro* de segmentos de hojas de guayabo.

## Materiales y métodos

Se trabajó con plantas de guayabo obtenidas *in vitro* en el Departamento de Biotecnología del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) de Maracay, estado Aragua. Estas plantas al momento de coleccionar el material vegetal para la siembra presentaban 6 meses de edad y crecían en macetas expuestas al aire libre. Se tomaron hojas de brotes jóvenes, de la tercera y/o cuarta posición en sentido descendente desde la parte apical del brote (figura 1a), sin daños o perforaciones para reducir la posibilidad de hojas enfermas que pudieran afectar los resultados. Las hojas se lavaron por 30 min con agua corriente y jabón para eliminar los posibles agentes contaminantes externos, tales como; microorganismos, polvo, insectos y otros. Luego se seccionaron en segmentos de aproximadamente 0,5 cm x 0,5 cm, sin incluir la nervadura central y el borde de la hoja (figura 1b). Se realizaron 3 tratamientos para controlar la contaminación:

T0: 10 min en benomil (14 g L<sup>-1</sup>), 1 min en alcohol etílico al 70 %.

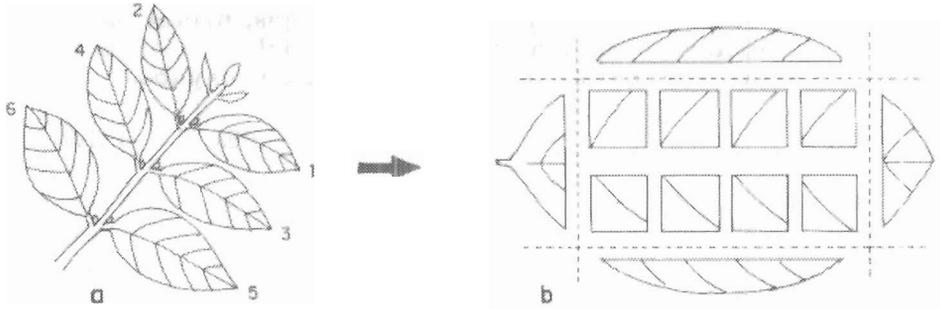
T1: 10 min en benomil (14 g L<sup>-1</sup>), 1 min en alcohol etílico al 70 % y 5

min en hipoclorito de calcio al 10 % (p/v).

T2: 30 min en benomil (14 g L<sup>-1</sup>) + rifampicina (300 mg L<sup>-1</sup>), 1 min en alcohol etílico al 70 % y 15 min en hipoclorito de calcio al 10 % (p/v).

Al finalizar cada tratamiento de desinfección superficial se enjuagó el material 3 veces con agua destilada esterilizada y se sumergió por 15 min en una solución antioxidante (3), para proceder a la siembra de explantes verdes, sin decoloración. La superficie adaxial de la hoja se colocó en contacto con el medio de cultivo. Se utilizaron 10 mL de medio nutritivo de Murashige y Skoog (MS) (10) complementado con 1 mg L<sup>-1</sup> de las siguientes vitaminas: tiamina, piridoxina y ácido nicotínico, 100 mg L<sup>-1</sup> de mioinositol, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 7 g L<sup>-1</sup> de agar. El pH del medio se ajustó a 5.8 ± 0.02 antes de la esterilización en el autoclave a 121°C y 15 kg cm<sup>-2</sup> por 20 min. Los explantes se incubaron a 26 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h bajo luz fluorescente con irradiancia de 16,95 W m<sup>-2</sup>.

Para evaluar el efecto de las citocininas a varios niveles de concentración, se utilizó el método de desin-



**Figura 1. a) Brote de la planta indicando la posición relativa de la hoja. b) Seccionamiento de la hoja de la tercera y/o cuarta posición en el brote. Tamaño del segmento de hoja 0,5 cm x 0,5 cm.**

fección superficial T2. La siembra, medio nutritivo e incubación de los explantes fueron iguales a las mencionadas. Los tratamientos se obtuvieron de la combinación de cinco fuentes de citocininas y tres niveles de concentración. Las citocininas fueron: rizozeatina (RZEA), zeatina (ZEA), kinetina (KIN), benciladenina (BA) y 2-isopenteniladina (2ip). Los niveles de concentración para 2ip y BA fueron 1, 5 y 10 mg L<sup>-1</sup>, y para el resto de las citocininas 0,1; 0,5 y 1 mg L<sup>-1</sup>. El testigo estuvo representado por cero citocinina.

El diseño estadístico fue totalmente al azar con 5 repeticiones. La unidad experimental fue de 5 explantes, valor muy cercano al determinado por Parra y Ascanio (12) para la variable número de hojas, en ápices de pimentón, la cual se encontraba entre 6 y 10 explantes. Las variables de estudio fueron porcentaje de explantes: con

hongos (PEH), con bacterias (PEB), contaminados por hongos y/o bacterias (PEC); oscurecidos (PEO), viables (PEV), con formación de callo (PEFC), doblados (PED) y porcentaje de medios con oscurecimiento u oscurecidos (PMO).

El PEO se midió en tres categorías. SO: Sin oscurecimiento, sólo en los cortes (hasta un 25 % de oscurecimiento en el explante). MO: Moderadamente oscurecido (desde 25% hasta 75%). TO: Totalmente oscurecido (más de 75% de oscurecimiento en el explante).

Los hongos se identificaron por medio de la presencia de micelio y las bacterias a través de los exudados presentes en el explante o alrededor de la parte basal de éste. Las variables fueron transformadas con la ecuación  $(y + 1)^{1/3}$  y analizadas con el programa SAS (14).

## Resultados y discusión

En el cuadro 1 se aprecia que hubo diferencias significativas entre

los tratamientos de desinfección superficial en los porcentajes de explantes

**Cuadro 1. Efecto del tratamiento de desinfección superficial en los porcentajes de explantes: con hongos, bacterias, contaminados por hongos y/o bacterias y viables, a los 16 días de cultivo *in vitro* de segmentos de hoja de guayabo.**

TDS	PEH	PEB	PEC	PEV
T0	84 <sup>a</sup>	56 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>
T1	68 <sup>b</sup>	48 <sup>a</sup>	82 <sup>a</sup>	48 <sup>b</sup>
T2	12 <sup>c</sup>	12 <sup>b</sup>	16 <sup>b</sup>	60 <sup>a</sup>

TDS: Tratamiento de desinfección superficial. PEH: Porcentaje de explantes con hongos. PEB: Porcentaje de explantes con bacterias. PEC: Porcentaje de explantes contaminados. PEV: Porcentaje de explantes viables. a, b, c: Medias con letras distintas difieren significativamente ( $P < 0,05$ ).

con hongos, bacterias, contaminados y viables. El método de desinfección superficial T2 mostró los menores valores de porcentaje de explantes con hongos, bacterias y contaminados, así como también, el mayor porcentaje de explantes viables a los 16 días de cultivo *in vitro*. Por lo tanto, T2 resultó ser el más adecuado y significativo en el control de los microorganismos contaminantes, que pueden afectar y ocasionar la muerte de los explantes con el tiempo. La menor contaminación en T2 podría relacionarse al mayor tiempo empleado en la mezcla de benomil más rifampicina y en el hipoclorito de sodio. En este sentido, Vilorio (18) trabajó con varios tratamientos de desinfección superficial que incluyeron el uso de captan y rifadín en combinación con hipoclorito de calcio, con resultados de alta incidencia de hongos y bacterias que se relacionaron más con el tiempo de lavado que con las concentraciones utilizadas; además, indica que la viabilidad de los explantes estuvo asociada con el tipo de desinfectante aplicado y su concentración.

En el cuadro 2 se aprecia el comportamiento de la variable PEO. A los 8 días estaba mayormente en la categoría SO en todos los tratamientos, posteriormente a los 32 días, la mayoría de los explantes se encontraron en TO, indicando que hubo una tendencia al oscurecimiento de los tejidos del explante con el transcurso del tiempo, tal vez debido a que el explante requiere de uno o dos cambios a medio fresco en el período de 32 días o mayor volumen gaseoso en el recipiente, en vista que Dublín (2) reseña que los factores: frecuencia de suculativos, temperatura, luz, volumen gaseoso y forma de los recipientes de cultivo podrían modificar la velocidad de crecimiento de tallos de café cultivados *in vitro*. Otra causa podría ser la incubación de los explantes bajo 16 h diarias de luz, ya que en *Uimus pumila*, Kapaun y Cheng (6) indican que la mayoría de los explantes foliares comenzaron a tornarse oscuros después de las 3 semanas de cultivo y que la senescencia de los explantes y callos fue demorada por 1 ó 2 semanas cuando éstos se incubaron en oscuri-

**Cuadro 2. Efecto de las citocininas en el porcentaje de explantes oscurecidos durante el cultivo *in vitro* de segmentos de hojas de guayabo.**

Tratamiento mg L <sup>-1</sup>	Porcentaje de explantes oscurecidos								
	8 días			16 días			32 días		
	SO	MO	TO	SO	MO	TO	SO	MO	TO
Testigo	88	0	12	28	48	24	0	0	100
1 BA	80	0	20	48	12	40	0	0	100
5 BA	84	0	16	40	28	32	0	4	96
10 BA	72	4	24	52	12	36	0	0	100
1 2ip	76	8	16	60	8	32	0	4	96
5 2ip	96	0	4	56	4	40	4	8	88
10 2ip	92	0	8	60	4	36	8	4	88
1 KIN	80	4	16	72	0	28	0	0	100
5 KIN	80	0	20	52	12	36	4	0	96
10 KIN	84	0	16	0	64	36	0	0	100
0,1 RZEA	92	0	8	0	60	40	0	8	92
0,5 RZEA	92	0	8	60	12	28	4	4	92
1 RZEA	96	0	4	60	16	24	0	0	100
0,1 ZEA	80	0	20	48	16	36	0	0	100
0,5 ZEA	80	4	16	56	20	24	0	4	96
10 ZEA	84	4	12	0	64	36	0	0	100

Testigo: sin citocinina. BA: Benciladenina. 2ip: 2-isopenteniladenina. KIN: Kinetina. RZEA: Ribozeatina. ZEA: Zeatina. SO: sin oscurecimiento. LO: Moderadamente oscurecido. TO: Totalmente oscurecido.

dad, además, comentan que el tratamiento de oscuridad es beneficioso para la regeneración de plantas en diversas especies leñosas. Sin embargo, investigaciones de Salazar y Romero (13) efectuadas en ajonjolí señalan que la presencia de luz fue indispensable para la producción de masas de callo 15 días después de la siembra, estas diferencias pueden ser motivadas a la diferencia de especies.

Se observó que las nervaduras secundarias presentes en el segmento de hoja permanecieron verdes hasta los

32 días en algunos de los explantes y en la zona de corte hubo formación de callo de color verde. Kapaun y Cheng (6) observaron dos tipos de formación de callo en el explante; uno blanco y compacto, y otro de color verde cristalino, este último se presentó mayormente en el corte del nervio medio y en las regiones de las nervaduras secundarias, lo cual coincide con lo antes mencionado. Trabajos de Lugo y León (9) indican que la formación de callo en discos de mesocarpo de guayabo cultivados en medio McCown y Lloyd

fue de aspecto compacto y con presencia de protuberancias irregulares.

En la mayoría de los explantes se apreció oscurecimiento de los cortes y en algunos decoloración después de la desinfección superficial, posiblemente como consecuencia del tratamiento de desinfección superficial. Salazar y Romero (13) encontraron que los explantes tendieron a tornarse oscuros y totalmente blancos por la acción del hipoclorito de calcio.

El cuadro 3 señala un bajo o ningún PMO, lo cual indica que los explantes produjeron una baja emisión de exudados de compuestos fenólicos

hasta los 32 días. El PEV fue alto en todos los tratamientos a los 8 días, aunque, luego disminuyó notablemente hasta los 32 días, donde se observaron porcentajes entre 0 y 12 %. La baja viabilidad podría estar influenciada por un equilibrio gaseoso inadecuado, por poco volumen en el tubo de ensayo que posiblemente conlleve al oscurecimiento del explante. Al respecto, Dublin (2) indica que un aumento en el volumen de los recipientes de cultivo y/o en la frecuencia de subcultivos podrían tener efectos positivos en la tasa de proliferación de callo y de viabilidad del explante.

**Cuadro 3. Efecto de las citocininas en los porcentajes de medios oscurecidos y de explantes viables durante el cultivo *in vitro* de segmentos de hojas de guayabo.**

Tratamiento mg L <sup>-1</sup>	PMO			PEV		
	8 días	16 días	32 días	8 días	16 días	32 días
Testigo	0	8	8	88	76	0
1 BA	0	4	4	80	60	0
5 BA	0	0	4	84	68	4
10 BA	0	0	0	76	64	0
1 2ip	0	0	0	84	68	4
5 2ip	0	0	0	96	60	12
10 2ip	0	4	4	92	64	12
1 KIN	0	0	0	84	72	0
5 KIN	4	8	8	80	64	4
10 KIN	0	0	0	84	64	0
0,1 RZEA	4	4	4	92	60	8
0,5 RZEA	0	0	0	92	72	8
1 RZEA	0	0	0	96	76	0
0,1 ZEA	8	8	8	80	64	0
0,5 ZEA	4	4	4	84	76	4
10 ZEA	0	0	0	88	64	0

PMO: Porcentaje de medios oscurecidos. PEV: Porcentaje de explantes viables. Testigo: sin citocinina. BA: Benciladenina. 2ip: 2-isopenteniladenina. KIN: Kinetina. RZEA: Ribozeatina. ZEA: Zeatina.

La formación de callo fue del tipo parenquimatosa y se manifestó a los 16 días de cultivo, ocurriendo un pequeño incremento a los 32 días en la mayoría de los tratamientos (cuadro 4). En trabajos de Salazar y Romero (13) la iniciación de formación de callo se dio a los 15 días de cultivo *in vitro* del ajonjolí, lo cual coincide con los resultados mencionados, aunque, en investigaciones de Kapaun y Cheng (6) la formación de callo fue visible a partir de los 7 días.

En el cuadro 4 se indica que el tratamiento que indujo el mayor PEFC fue 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ZEA (80%), seguido por 10 mg L<sup>-1</sup> de 2ip (76%), no presentando diferencias significativas con los tratamientos 5 mg L<sup>-1</sup> de 2ip (68%). Los menores valores lo alcanzaron el testigo, 10 mg L<sup>-1</sup> de BA, 0,5 y 1 mg L<sup>-1</sup> de RZEA. Se observa además que hubo un incremento apreciable en el PEFC en el período de 16 a 32 días en 1 mg L<sup>-1</sup> de BA, 5 y 10 mg L<sup>-1</sup> de 2ip y 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ZEA, debido posible-

**Cuadro 4. Efecto de las citocininas en los porcentaje de explantes con formación de callo y explantes doblados durante el cultivo *in vitro* de segmentos de hojas de guayabo.**

Tratamiento mg L <sup>-1</sup>	Porcentaje explantes con formación de callo		Porcentaje de explantes doblados	
	16 días	32 días	16 días	32 días
Testigo	16	16 <sup>gh</sup>	52	52 <sup>d</sup>
1 BA	20	36 <sup>e</sup>	48	52 <sup>de</sup>
5 BA	28	32 <sup>ef</sup>	40	48 <sup>e</sup>
10 BA	16	24 <sup>g</sup>	40	56 <sup>d</sup>
1 2ip	56	60 <sup>c</sup>	<b>60</b>	<b>64<sup>c</sup></b>
5 2ip	48	68 <sup>ab</sup>	<b>68</b>	<b>72<sup>b</sup></b>
10 2ip	52	76 <sup>a</sup>	<b>56</b>	<b>64<sup>c</sup></b>
1 KIN	48	48 <sup>d</sup>	52	52 <sup>de</sup>
5 KIN	48	56 <sup>cd</sup>	48	56 <sup>d</sup>
10 KIN	32	32 <sup>ef</sup>	40	40 <sup>f</sup>
0,1 RZEA	28	36 <sup>e</sup>	60	64 <sup>c</sup>
0,5 RZEA	16	24 <sup>g</sup>	52	52 <sup>de</sup>
1 RZEA	16	20 <sup>g</sup>	48	48 <sup>e</sup>
0,1 ZEA	32	40 <sup>e</sup>	56	60 <sup>cd</sup>
0,5 ZEA	64	80 <sup>a</sup>	76	76 <sup>b</sup>
10 ZEA	48	52 <sup>d</sup>	80	84 <sup>a</sup>

Testigo: sin citocinina. BA: Benciladenina. 2ip: 2-isopenteniladenina. KIN: Kinetina. RZEA: Ribozeatina. ZEA: Zeatina. a, b, c, d, e, f, g, h: Medias con letras distintas indican diferencias significativas (P < 0,05). Medias con letra en negrita indica que no ocurrió doblamiento hacia la cara que estaba en contacto con el medio de cultivo, sino deformación de los bordes cortados del explante.

mente a la concentración de estas citocininas.

La formación de callo se produjo solamente en los cortes del explante poco oscurecido y en las nervaduras, por lo que sería conveniente realizar cortes nuevos en el explante antes de sembrarlo, ya que en estudios histológicos de *Coffea arabica* se ha demostrado que el callo se origina en las células del mesófilo de los bordes cortados en el explante foliar (15, 16). Así como también, incubar los explantes bajo oscuridad por cierto período de tiempo, de 14 ó 15 días después de la siembra (6, 11), debido a que Kapaun y Cheng (6) encontraron que los explantes cultivados bajo oscuridad produjeron mayor cantidad de callo que aquellos en presencia de luz. En parchita, Otahola (11) señala la regeneración de plantas a partir de discos foliares, en su metodología incluyó la incubación de los explantes por 15 días en oscuridad después de la siembra.

A los 16 días de la siembra, los bordes cortados del explante tendieron a doblarse hacia la cara adaxial de la hoja que estaba en contacto con el medio de cultivo. El PED permaneció casi constante en el tiempo, apenas existió un pequeño aumento, en el período de 16 a 32 días. El doblamiento del segmento de hoja podría ser debido a un incremento diferencial en el número de células en la cara abaxial de la hoja, que no se encontraba en contacto con el medio. En los tratamientos con la hormona 2ip, no se observó el doblamiento del segmento de hoja, sino deformación de los cortes del explante con abundante prolifera-

ción de callo, debido posiblemente a que esta citocinina sea altamente activa. Al respecto, Krikorian (7) menciona que existen citocininas más activas que otras. Por su parte, Dublín (2) indica que en medios muy ricos en citocininas, el desarrollo de las yemas neoformadas puede ser bloqueado y no formarse tallos.

Durante los primeros 32 días de cultivo se observaron fases de callogénesis temprana, indicando la posibilidad potencial de desarrollo de primordios foliares y de hojas, si se mejorara el problema de oscurecimiento de los tejidos. No obstante, los resultados señalan que la iniciación de callos es rápida y que la mayor proliferación se presenta cuando al medio se le añade algunas de las citocininas: 5, 10 mg L<sup>-1</sup> de 2ip ó 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ZEA, sin embargo, estos resultados no coinciden con investigaciones efectuadas por Ibarrán *et al.* (5) y Otahola (11) quienes señalan niveles de 0,2 y 0,6 mg L<sup>-1</sup> de BA, respectivamente, posiblemente las concentraciones de las citocininas evaluadas fueron muy altas.

No se observó respuesta de formación de brotes posiblemente debido a que los tejidos del explante tendieron a oscurecerse y morir cerca de los 32 días. Al respecto, Ibarrán *et al.* (5) señalan el necrosamiento y muerte del tejido del explante foliar procedente de plántulas germinadas *in vitro*, al utilizar concentraciones mayores de 0,2 mg L<sup>-1</sup> de BA durante el cultivo de caoba (*Swietenia macrophylla*) bajo condiciones de 16 h diarias de luz, sin embargo, observaron la formación de una estructura nodu-

lar en el nervio medio de los explantes cuando fueron cultivados en MS más 0,09, 0,1 ó 0,2 mg L<sup>-1</sup> de BA.

Investigaciones de Salazar y Romero (13) coinciden en que la causa principal de pérdida de los explantes fue el oscurecimiento de los tejidos y que no observaron regeneración de ningún tipo de estructuras en los explantes.

Loh y Rao (8) consideraron la posibilidad de alguna influencia del

ápice y del sistema radicular de los brotes en la protuberancias formadas en hojas intactas procedentes de plántulas de guayabo de 5 a 7 semanas de germinadas *in vitro* en medio MS más BA a dosis de 0,1 y 0,5 mg L<sup>-1</sup>; otra posibilidad es que la composición del medio de cultivo para regeneración de brotes a partir de segmentos de hojas no era inductivo para la formación de yemas adventicias o meristemoides caulinares.

## Conclusiones

El establecimiento aséptico de segmentos de hojas se obtuvo remojando por 30 min en agua jabonosa, 30 min en benomil (14 g L<sup>-1</sup>) más rifampicina (300 mg L<sup>-1</sup>), 1 min en alcohol etílico al 70% y 15 min en hipoclorito de calcio al 10% (p/v).

La formación de callo se manifestó a los 16 días de cultivo y se produjo solamente en los cortes del explante foliar poco oscurecido.

Los tratamientos 0,5 y 1 mg L<sup>-1</sup> de 2-isopenteniladenina y 0,5 mg L<sup>-1</sup> de zeatina indujeron el mayor porcentaje de explantes con formación de callo a los 32 días.

Los explantes tendieron a doblarse hacia la cara adaxial de la hoja en

contacto con el medio de cultivo, a excepción de aquellos tratados con 2-isopenteniladenina que manifestaron deformación de los cortes o lados del explante foliar.

El porcentaje de explantes oscurecidos tendió a incrementarse y el porcentaje de explantes viables a disminuir después de los 16 días de la siembra.

El oscurecimiento fue la causa principal de mortalidad de los explantes.

La viabilidad de los explantes se presume que dependa de los factores que ocasionan el oscurecimiento de los tejidos.

## Recomendaciones

Efectuar el corte de los explantes después de la desinfección superficial de las hojas.

Evaluar menores concentraciones de las citocininas.

Incubar los explantes por 15 días en oscuridad después de la siembra.

Considerar la posición o cara de la hoja, adaxial y abaxial, en el medio de cultivo.

## Agradecimientos

Al Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) y a su departamento de Biotecnología en Maracay estado Aragua por su aceptación y colaboración para realizar la Práctica Profesional de Posgrado. Al Ing. Agr. Efraín Salazar, Msc. por su tutoría en la Práctica Profesional.

Al Ing. Agr. Aly Urdaneta por colaboración para el desarrollo de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) por la Beca otorgada para cursar estudios de Maestría en Fruticultura en La Universidad del Zulia.

## Literatura citada

1. Arenas O. M. L., R. Sánchez, A. Jiménez y E. Lozano S. 1995. Establecimiento de las condiciones para el cultivo *in vitro* del maracuya amarillo *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*. En resúmenes: 41 Reunión Anual de la Sociedad Interamericana de Horticultura Tropical. Santa Marta, Colombia.
2. Dublín, P. 1991. Multiplicación vegetativa del café y cacao. En: M. W. Roca y L. A. Mroginski (Eds). Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) 151: 577-619.
3. Fitchet P., M 1990. Dimple guava established in tissue culture. Inlightingsbulletin Navorsingsinstituut vir Sitrus en Subtropiese Vruchte N° 212: 5.
4. Furelli, L. y E. C. de García. 1987. Regeneración de plantas a partir de explantes foliares del helecho *Pteris cretica* "Win Setti". Agronomía Tropical 37 (1-3): 19-30.
5. Ibarrán, J. G.; M. Vielma y M. Tacoronte. 1997. Estudio de organogénesis *in vitro* en *Swietenia marophylla* King. En resúmenes: XIII Congreso Venezolano de Botánica. Revista Científica UNET 9 (1): 34.
6. Kapaun, J. A. y Z. M. Cheng. 1997. Plant regeneration from leaf tissues of siberian elm. HortScience 32 (2): 301-303.
7. Krikorian, A.D. 1991. Medios de cultivo: Generalidades, composición y preparación. En: W. M. Roca y L. A. Mroginski (Eds). Cultivo de tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) 151: 41-77.
8. Loh, C. S. y A. N. Rao. 1989. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from seedling and grafted plants: and adventitious shoot formation *in vitro*. Scientia Horticulturae 39: 31-39.
9. Lugo, U. y S. León. 1991. Evaluación de explantes y medios de cultivos en la callogénesis de *Psidium guajava* L. Rev. Fac. Agron. (LUZ) 8 (4): 237.
10. Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tabaco tissue. Phys. Plant 15 (3): 473-494.
11. Otahola, V. 1997. Regeneración de plantas de parchita (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) a partir de cultivo "in vitro" de hojas. En resúmenes: XIII Congreso Venezolano de Botánica. Revista Científica UNET 9 (1): 36.
12. Parra, J. y M. Ascanio E. 1997. Determinación del tamaño de la unidad experimental y el muestreo dentro de la misma en ápices de pimentón (*Capsicum annum* L.) y callos de canavalia (*Canavalia ensiformis* L.) cultivados *in vitro*. 25 p. En resúmenes: XIII Jornadas Agronómicas. Maracay, Venezuela.

13. Salazar, E. y C. Romero. 1997. Cultivo *in vitro* de segmentos de hojas de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.). Rev. Fac. Agron. (LUZ) 13 (3): 293-302.
14. SAS, Institute, INC. 1987. SAS (Statistical Analysis System) the Institute INC, Cary, NC, USA.
15. Sondhal, M. R. y W. R. Sharp. 1979. A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphysiol 94: 101-108.
16. Sondhal, M., T. Nakamura y W. Sharp. 1991. Propagación *in vitro* del café. En: W. M. Roca y L. A. Mroginski (Eds). Cultivo de tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) 151:621-642.
17. Tong K., O. L. y K. Khay C. 1990. Guava in Malaysia. Production, pests and diseases. First edition. Tropical Press SDN. BHD. Malaysia.
18. Vilorio V., Z. J. 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 pp.
19. Welander, M. 1988. Plant regeneration from leaf and stem segments of shoot raised *in vitro* from mature apple trees. J. Plant Physiol. 132: 738-744.