

# Multiplicación *in vitro* de *Psidium guajava* L. en sistemas de inmersión temporal

## *In vitro* multiplication of *Psidium guajava* L. in temporary immersion systems

Jorge Vilchez\*, Nilca Albany\*\*

### Resumen

La introducción de nuevos cultivares de guayabo (*Psidium guajava* L.) amerita su propagación masiva, lo cual solo puede ser satisfecho mediante la micropropagación. Sin embargo la micropropagación convencional dejó de ser económicamente eficiente, debido al uso de agentes gelificantes y el elevado número de operaciones manuales, por esta razón se planteó en esta investigación, generar una metodología que permita disminuir los costos de producción por la exclusión del gelificante en los medios de cultivo, evaluando los sistemas de inmersión temporal (SIT) en la multiplicación *in vitro* de guayabo. Para lo cual, se evaluó el efecto del cultivo en SIT, se comparó los SIT tipo BIT® y RITA® y se evaluó el tiempo (1 y 2 min) y frecuencia (3 y 4 veces/día) de inmersión. Luego de seis semanas de cultivo se evaluó: número de brotes (NB), número de nudos (NN), longitud de brote (LB) y coeficiente de multiplicación (CM). Con el empleo de SIT se logró valores superiores para NB (2,17), NN (3,5), LB (10,7 mm) y CM (2,8). En la comparación entre SIT tipo RITA y BIT, valores superiores se obtuvieron con el RITA® para NB (3,8), NN (3,8), LB (16,6 mm) y CM (10,4). Se determinó que con 2 min de inmersión se logró los mayores valores de NB (3,7), NN (13,4), LB (15,3 mm) y con 2 min de inmersión 3-4 veces/día el mayor CM (9,4 y 10,4). Se concluye que el cultivo en RITA® en la multiplicación favoreció crecimiento y la proliferación de brotes de guayabo.

**Palabras clave:** BIT®, guayabo, medio de cultivo líquido, micropropagación, RITA®.

### Abstract

The introduction of new cultivars of guava (*Psidium guajava* L.) deserves its mass propagation, which can only be satisfied by micropropagation. However conventional micropropagation stopped being economically efficient due to the use of gelling agents and the high number of manual operations. For this reason was considered in this research, generate a methodology to reduce production costs by exclusion of gelling in culture media, assessing temporary immersion systems (TIS) in the *in vitro* multiplication of guava. For which, the effect of the culture way was evaluated in TIS, type TIB® and RITA® compared the TIS and was evaluated the time (1 and 2 min) and frequency (3 and 4 times / day) of immersions. After six weeks of culture were evaluated: shoots number (NS), nodes number (NN), shoot length (SL) and multiplication rate (MR). With the use of TIS higher values for NS (2.17), NN (3.5), SL (10.7 mm) and MC (2.8) was achieved. When comparing RITA® and TIB, higher values were obtained with the RITA® for NS (3.8), NN (3.8), SL (16.6 mm) and MC (10.4). It was determined that 2 min of immersion with the highest values of NS (3.7), NN (13.4), SL (15.3 mm) and 2 min immersion 3-4 times/day achieved the highest MC (9.4 and 10.4). We conclude that the RITA® culture favored the multiplication in growth and proliferation of shoots of guava.

**Keys words:** guava, micropropagation, liquid culture media, RITA®, TIB®.

**Recibido:** febrero 19 de 2014

**Aprobado:** octubre 10 de 2014

\* Profesor Titular. Master en Biotecnología Vegetal. Departamento de Botánica, Laboratorio de Fisiología Vegetal "Merylin Marin" Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, AP 15205, Maracaibo, Edo. Zulia (4005ZU), República Bolivariana de Venezuela. jvilchezp@fa.luz.edu.ve

\*\* Profesora Titular. Master en Biotecnología Vegetal. Departamento de Química. Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, AP 15205, Maracaibo, Edo. Zulia (4005ZU), República Bolivariana de Venezuela. nalbany@fa.luz.edu.ve

## Introducción

El guayabo (*Psidium guajava* L.) constituye la *Myrtaceae* más valiosa de todo el género *Psidium* (Peña *et al.*, 1996) y representa una importante inversión como agronegocio (Cañizares y Puesme, 2003), entre otras razones, por su gran aceptación como fruta fresca debido a su contenido nutricional y su posibilidad de industrialización (Aular y Casares, 2011). Además en los últimos años sus frutos y hojas se han estudiado para uso en el campo de la medicina natural y tradicional en el tratamiento de la gastroenteritis, diarreas y disenterías (Waghode, 2014; Choudhury *et al.*, 2013; Joseph y Priya, 2011).

En Venezuela hay pocos cultivares y los principales son el 'Criolla Roja', que se utiliza también como porta injerto, el 'San Miguel' y el 'Río Chiquito' (Aular y Casares, 2011). En el año 2007 en el marco del Convenio de Cooperación Cuba-Venezuela se introdujo desde la República de Cuba el cultivar "Enana Roja Cubana EEA 18-40", el cual es de alto potencial productivo con más de 70 t·ha<sup>-1</sup>·año<sup>-1</sup> a densidades superiores a las 800 plantas por hectárea en los primeros 5 años de plantada (Vento, 2011), del cual se sembraron en el país lotes pruebas para su producción agrícola y propagación. La introducción de este cultivar plantea la necesidad de desarrollar protocolos de propagación para la misma.

En general la propagación convencional presenta limitaciones relacionadas con el número de esquejes o vástagos que puede proveer un individuo elite o superior (Peña *et al.*, 1996), este aspecto hace más lenta la introducción de nuevos cultivares a escalas productivas. Teniendo en cuenta estos problemas y el significado que tiene este frutal tropical en la producción y exportación de alimentos, se han dedicado numerosos esfuerzos y recursos a aplicar técnicas biotecnológicas en este grupo de plantas (Litz y Jaiswal, 1991; Akhtar *et al.*, 2000). La mayoría de éstos trabajos estuvieron dirigidos a desarrollar procedimientos para la micropropagación, utilizando la organogénesis a partir de segmentos nodales y brotación axilar (Meghwal *et al.*, 2010; Rai *et al.*, 2009; Ocampo y Nuñez, 2007; Mishra *et al.*, 2007; Concepción *et al.*, 2004; Ali *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2002; Amin y Jaiswal 1987, 1988, 1989; Jaiswal y Amin, 1987).

Algunos investigadores señalan que desde el punto de vista comercial, la micropropagación convencional ha dejado de ser un proceso económicamente eficiente, coincidiendo que la causa fundamental es debida al uso de agentes gelificantes como soportes de los explantes y el elevado número de operaciones manuales, que implican un alto costo por mano de obra (Quiala *et al.*, 2012; Cruzat, 2009; Pérez *et al.*, 1998). Particularmente en la micropropagación de algunos vegetales y frutales, los altos costos por mano de obra están alrededor del 65-70% de los costos totales de producción (Cruzat, 2009; Alchanatis *et al.*, 1994) y el empleo de

medios de cultivos semisólido o gelificados con agar o polímeros similares son el componente más caro de medios de cultivo y representan alrededor del 80% del costo total (Cruzat, 2009; Adelberg *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 1998). Nuevos estudios sobre la propagación *in vitro* utilizando diferentes condiciones de cultivo pueden contribuir a una mayor optimización de la procesar y una reducción en los costos de producción (Ziv, 2005).

El uso de medios líquidos en procesos de micropropagación se considera la solución ideal para reducir los costos de producción de plántulas y permitir la automatización (Preil, 2005; Ziv, 2005). Entre otras ventajas porque los sistemas de cultivo líquidos proporcionan condiciones de cultivo uniformes, el medio puede ser renovado fácilmente sin necesidad de cambiar de recipiente, la limpieza del recipiente luego de un período de cultivo es más fácil y se reducen los subcultivos (Adelberg, 2004). Su uso a menudo resulta en mayores tasas de crecimiento en relación con el medio semisólido. Esto se debe a que una mayor superficie del explante está en contacto con el medio, y cuando es aireado o agitado se reducen los gradientes de difusión entre éste y el explante (Etienne y Berthouly, 2002). Estos dos factores combinados permiten una toma de nutrientes y reguladores de crecimiento más eficiente, de modo que en algunas especies es posible emplear medios de cultivo desprovistos de reguladores. Al mismo tiempo, los metabolitos tóxicos que pueden acumularse en la proximidad de los tejidos, son eficientemente dispersados (George, 1993).

Sin embargo, la inmersión continua de los tejidos provoca síntomas de estrés oxidativo producto del incremento de los niveles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> debido a los bajos niveles de oxígeno en el medio (Saher *et al.*, 2004; Damiano *et al.*, 2003) e hiperhidratación de los tejidos o vitrificación, desorden morfológico y fisiológico que provoca una estructura cristalina y acuosa del tejido, además de un crecimiento distorsionado (Posada *et al.*, 2003). Para solucionar estos problemas en la actualidad se disponen de equipos para la propagación masiva basados en una inmersión temporal de los explantes, en los cuales la intervención de la mano de obra se minimiza, (Berthouly y Etienne, 2005; Teisson y Alvard, 1994; Alvard *et al.*, 1993; Aitken-Christie, 1991) y la hiperhidratación puede ser controlada, incluso suprimirse, controlando factores tales como la concentración de carbohidratos, macronutrientes en el medio, así como el tiempo y frecuencia de inmersión (Castro y González, 2002). Las ventajas de estos sistemas sobre la micropropagación tradicional en medios gelificados parecen ser el resultado de las condiciones físicas creadas en el recipiente de cultivo y que han sido señaladas por varios autores (Posada *et al.*, 2003; Etienne y Berthouly, 2002; Alvard *et al.*, 1993).

El sistema RITA®, Recipiente para inmersión temporal automatizado (figura 1b) desarrollado por el Labora-

torio Biotrop del CIRAD en Montpellier, Francia, es el más difundido en el mundo y se ha utilizado exitosamente para la propagación de varias especies de interés agrícola, ornamental y medicinal (Berthouly y Etienne, 2005) tanto por organogénesis como embriogénesis. El diseño de los RITA® consiste en un envase de cultivo de 1 L de capacidad en cuyo interior se encuentra una estructura que divide el envase de cultivo en dos compartimientos, el superior aloja material vegetal y el inferior el medio de cultivo, ambos compartimientos están conectados mediante un tubo central unido a un filtro de aire (22 µm) esterilizable. En cada inmersión se aplica una presión de aire al compartimiento inferior se hace subir el medio de cultivo que baña periódicamente el material vegetal y renueva en ambiente gaseoso del compartimiento de cultivo. De acuerdo a un programa predeterminado (tiempo de inmersión y frecuencia) que es controlado mediante un controlador de tiempo automatizado y válvulas solenoides controlan la inyección del aire o inmersión.

El BIT®, bioreactor de inmersión temporal (Escalona *et al.*, 1999) o recipientes gemelos de inmersión temporal (Berthouly y Etienne, 2005), es una unidad de inmersión temporal que consiste en dos recipientes interconectados por tubos de silicona (figura 2). Uno se usa para la contener del medio de cultivo y el otro para el cultivo del material vegetal. Para la ventilación se ajusta un filtro esterilizable (22 µm) en cada recipiente. El número de veces (frecuencia) y el tiempo que las plantas son inmersas en el medio se regulan mediante un programador conectado a válvulas solenoides. Al abrir una de las válvulas el medio es inyectado desde el recipiente que contiene al medio de cultivo al que contiene los explantes; al abrirla otra vez, el medio vuelve al recipiente que contiene el medio de cultivo. Con este sistema los explantes son inmersos en el medio de cultivo sólo por un tiempo definido, permitiendo la absorción de nutrientes por toda su superficie (Alvard *et al.*, 1993). El intercambio gaseoso se restaura cuando el medio de cultivo es trasladado a recipiente que contiene el medio de cultivo. De los BIT® se han propuesto algunas variantes para los tamaño de los recipientes de cultivo, afín de mejorar la eficiencia de la micropropagación, como Jiménez (2005) en caña de azúcar Albany *et al.* (2005) en banana, quienes utilizaron envases de 10 L Clearboy de Nalgene®.

Con el propósito de generar una metodología que permita disminuir los costos de producción por la exclusión del gelificante en los medios de cultivo, se evaluó el cultivo en sistemas de inmersión temporal en la fase de multiplicación *in vitro* de guayabo cv Enana Roja Cubana EEA-1840.

## Materiales y métodos

Esta investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología "Profa. Silvia León de Sie-

rralta" de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia en Maracaibo, Venezuela.

## Material vegetal

Como material vegetal se emplearon microesquejes de guayabo del cultivar "Enana Roja Cubana EEA 1840" de 1 cm de longitud con un solo nudo. Los microesquejes fueron tomados de vitroplantas obtenidas vía germinación de embriones somáticos, cultivados en medio Murashige y Skoog (1962) al 50% de las sales mayores y suplementado con 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (N<sup>6</sup>-bencilaminopurina); 0,01 mg.L<sup>-1</sup> de DI-31 (análogo de brasinoesteroide) y 3% de sacarosa.

En todos experimentos el medio de cultivo, el pH se ajustó 5,8 con NaOH 1N y HCl 1N según el caso, antes de la esterilización en autoclave a 121°C y 1,2 Kg.cm<sup>-2</sup> durante 20 min. Todas las manipulaciones de los explantes se realizaron bajo condiciones de asepsia empleando una cámara de flujo laminar horizontal (ESCO®) con un flujo constante de aire de 0,5 PSI. El instrumental (pinzas y bisturí) fueron desinfectado con una solución de NaClO al 1% (v/v) durante 15 min y capsulas de Petri esterilizadas en autoclave a 121°C y 1,2 Kg.cm<sup>-2</sup> de presión durante 30 min y secadas en estufa a 70°C por 8 h. Los cultivos *in vitro* se mantuvieron en un cuarto de crecimiento, bajo luz blanca fluorescente continua con una radiación fotosintéticamente activa de 200 µmol<sup>-1</sup>m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, temperatura de 26 ± 1°C y humedad relativa promedio de 46 %.

## Efecto del cultivo en sistemas de inmersión temporal sobre la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840

Para comparar la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840, en sistemas de inmersión temporal (SIT) y en medio semisólido, se evaluó el cultivo de los microesquejes en SIT tipo bioreactor de inmersión temporal (BIT®) y el cultivo en medio gelificado con 6 g.L<sup>-1</sup> de Agargel. Para el tratamiento de cultivo en SIT se utilizaron 5 BIT® de 500 mL de capacidad y 200 mL de medio de cultivo, en los cuales se sembraron 20 microesquejes por cada BIT®. Se utilizó una inmersión de 1 min cada 6 h. Para el medio semisólido se utilizaron 20 frascos biotecnológicos de 250 mL de capacidad con 20 mL de medio de cultivo, en los cuales se sembraron 5 microesques por frasco, con 25 mL de medio de cultivo. El medio de cultivo utilizado fue el WPM (Woody Plant Medium) propuesto por Lloyd y McCow (1981), suplementados con 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP; 0,01 mg.L<sup>-1</sup> de DI-31, 3% de sacarosa. Las variables evaluadas después de seis semanas de cultivo fueron: número de brotes (NB), número de nudos (NN), longitud de brote (LB) y coeficiente de multiplicación (CM). El CM se calculó mediante la siguiente fórmula:  $CM = NNT - 1$ , donde en

NNT es el número de nudos totales. Se utilizó un diseño completamente al azar.

### Comparación del cultivo en SIT tipo BIT y RITA® sobre la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840

Para comparar la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840, en SIT tipo BIT® y RITA® se sembraron 5 repeticiones de cada tipo. En cada SIT se sembraron 20 explantes y contenía 200 mL de medio de cultivo. El medio de cultivo utilizado, así como las variables, el tiempo de evaluación y el diseño experimental utilizado fueron similares al del experimento 1.

### Determinación del Tiempo y frecuencia de inmersión en la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840 en RITA®

Para desarrollar un método de micropropagación eficiente en sistemas de inmersión temporal es esencial optimizar los parámetros técnicos para cada cultivo, siendo el tiempo y la frecuencia de inmersión los parámetros más críticos del sistema. Para determinar dichos parámetros mediante un diseño factorial se evaluaron dos frecuencias (3 y 4 veces al día) y dos tiempos de inmersión (1 y 2 min), para un total de cuatro tratamientos, cada uno con 5 repeticiones y 20 microesquejes por cada RITA®. El medio de cultivo utilizado, así como las variables, el tiempo de evaluación y el diseño experimental utilizado fueron similares al del experimento 1.

### Análisis estadístico

Para determinar la significancia estadística de los efectos de los factores de estudio se utilizó un análisis de la varianza simple (ANOVA) y en aquellos casos donde el efecto del factor de estudio y/o su interacción resultó significativa estadísticamente ( $p \leq 0,05$ ) se realizó la comparación de medias mediante la prueba de Tukey. Todas las pruebas estadísticas se realizaron utilizando software analítico Statistix® versión 8.0.

### Resultados y discusión

#### Efecto del cultivo en sistemas de inmersión temporal sobre la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840

Los análisis estadísticos detectaron diferencias altamente significativas ( $p < 0,01$ ) entre los dos sistemas de cultivo evaluados, para las variables NB y NN. Cuando se usaron los BIT® los valores en estas variables fueron superiores a los del cultivo de medio semisólido (tabla

1). Estas diferencias pudieran explicarse en función de que al multiplicar los brotes en medio semisólido la absorción de nutrientes es reducida, por la baja tasa de difusión del mismo (Scherwinski y De Luces, 2003) en comparación con los medios líquidos en los que la ausencia de agente gelificante puede incrementar la absorción de agua y nutrientes por el explante (Etienne y Berthouly, 2002; Alvard *et al.*, 1993).

**Tabla 1.** Efecto del cultivo en sistemas de inmersión temporal sobre la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840. NB: número de brotes, NN: número de nudos, CM: coeficiente de multiplicación y LB: longitud de brotes.

Sistema de cultivo	NB	NN	CM	LB (mm)
Semisólido	1,78 b	2,5 b	4,36 ns	10,38 ns
BIT	2,17 a	3,5 a	4,90 ns	10,74 ns

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente ( $P < 0,05$ ) para la prueba de comparación de medias de Tukey.

Por otro lado en los sistemas de inmersión temporal los explantes están en contacto intermitente con el medio de cultivo y esto causa una estimulación de la absorción de nutrientes por parte de los explantes, además los explantes están cubiertos la mayoría del tiempo por una fina capa de medio de cultivo que impide la desecación y por ende, la resistencia a la difusión de gases entre la atmosfera y el explante es menor, en consecuencia hay un mayor desarrollo de los explantes (Etienne y Berthouly, 2005). Es indudable que la mayor relación de volumen de medio nutritivo, microatmósfera versus explantes, favoreció notablemente la mayor diferenciación.

El cultivo en SIT ha sido exitoso en la mayoría de los cultivos en los cuales se ha probado (Mallón *et al.*, 2012; Quiala *et al.*, 2012; Watt, 2012; Steinmacher *et al.*, 2011; Peña *et al.*, 2010; Aragón *et al.*, 2009), sin embargo en el guayabo existe pocos reportes de su uso.

#### Comparación del cultivo en sistemas de inmersión temporal tipo BIT y RITA® sobre la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840

Después de seis semanas de cultivo, el análisis estadístico detectó diferencias estadísticas ( $p > 0,001$ ) entre los dos SIT estudiados; lográndose los mayores valores en las variables evaluadas con el empleo del SIT tipo RITA® (tabla 2). Aunque ambos SIT utilizados en este experimento tienen la misma capacidad del reservorio que contiene el medio de cultivo (500 mL), así como la

misma relación volumen de medio/explante (10 mL/explante) y similar principio de funcionamiento, difieren en las capacidades de sus reservorios que contienen los brotes y siendo este uno de los parámetros que afectan la eficiencia de los SIT (Berthouly y Etienne, 2005). En los RITA® (figura 4, b y d) la sección donde se cultivan los explantes es aproximadamente 50 mL mayor al de los BIT (figura 4, a y c), lo cual determina un mayor contacto entre los explantes.

**Tabla 2.** Comparación del cultivo en sistemas de inmersión temporal tipo BIT y RITA® sobre la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840. NB: número de brotes, ND: número de nudos, CM: coeficiente de multiplicación y LB: longitud de brotes.

Sistema de cultivo	NB	ND	CM	LB (mm)
BIT	2,17 b	2,5 b	4,36 b	10,74 b
RITA®	3,85 a	3,86 a	13,33 a	16,62 a

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente ( $p < 0,05$ ) para la prueba de comparación de medias de Tukey.

En los BIT® permanece una pequeña lamina de medio de cultivo que no regresa a su reservorio durante cada inmersión (figura 1, e), en el cual los microesquejes de guayabo permanecen en contacto permanente con el medio de cultivo, pudiendo ocasionar un bajo intercambio entre los explantes sumergidos en el medio de cultivo y el recipiente de cultivo. Según Jackson (2003) las tasas de difusión de gas son aproximadamente 10.000 veces más lentas en el agua que en el aire, ocasionando una reducción de en la fotosíntesis y respiración. Esta condición pudo incidir en una menor inducción de la brotación por ende un menor valor de las variables estudiadas (figura 1, f). En este sentido (Orellana, 1998) y Alvard *et al.* (1993), señala que la falta de oxígeno en el medio líquido es el factor limitante y responsable para bajo crecimiento y multiplicación de explantes, hecho que es fue evidente para el caso de los microesquejes de guayabo, lo cual pudiera estar relacionado con un estrés oxidativo producto del incremento de los niveles  $H_2O_2$  debido a los bajos niveles de oxígeno en el medio (Afanador, 2005). El efecto de la hipoxia en la multiplicación *in vitro* también ha sido señalado en otros cultivos como en piña variedad Golden (Molina y Cabrera, 2013), *Achyrocline flaccida* (Ross y Castillo, 2010), *Chrybdis* (Wawrosch *et al.*, 2005) y pino (Aitken-Christe *et al.*, 1985).

En la multiplicación *in vitro* de *Musa* AAA cv. Williams Giménez y Colmenares (2007) compararon el empleo de los dos SIT, el RITA® y un prototipo de SIT muy similar al BIT® y no encontraron diferencias en el índice de multiplicación, pero señalan que la mayor diferencia radica en que el costo de los prototipos similares

a los BIT® es  $1/4$  del costo de los RITA® además son fáciles de mantener y pueden escalarse con facilidad.

### Determinación del tiempo y frecuencia de inmersión en la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840 en sistemas de inmersión temporal tipo RITA®

El análisis estadístico detectó diferencias para el factor de estudio tiempo de inmersión para todas las variables estudiadas (tabla 3) y para la interacción tiempo y frecuencia de inmersión (tabla 4) para la variable CM, luego de seis semanas de cultivo.

Etienne y Berthouly (2005) señalan que en el cultivo en SIT es claro que el tiempo de inmersión es muy importante, ya este gobierna la absorción de nutrientes y la expresión de la hiperhidratación de los tejidos.

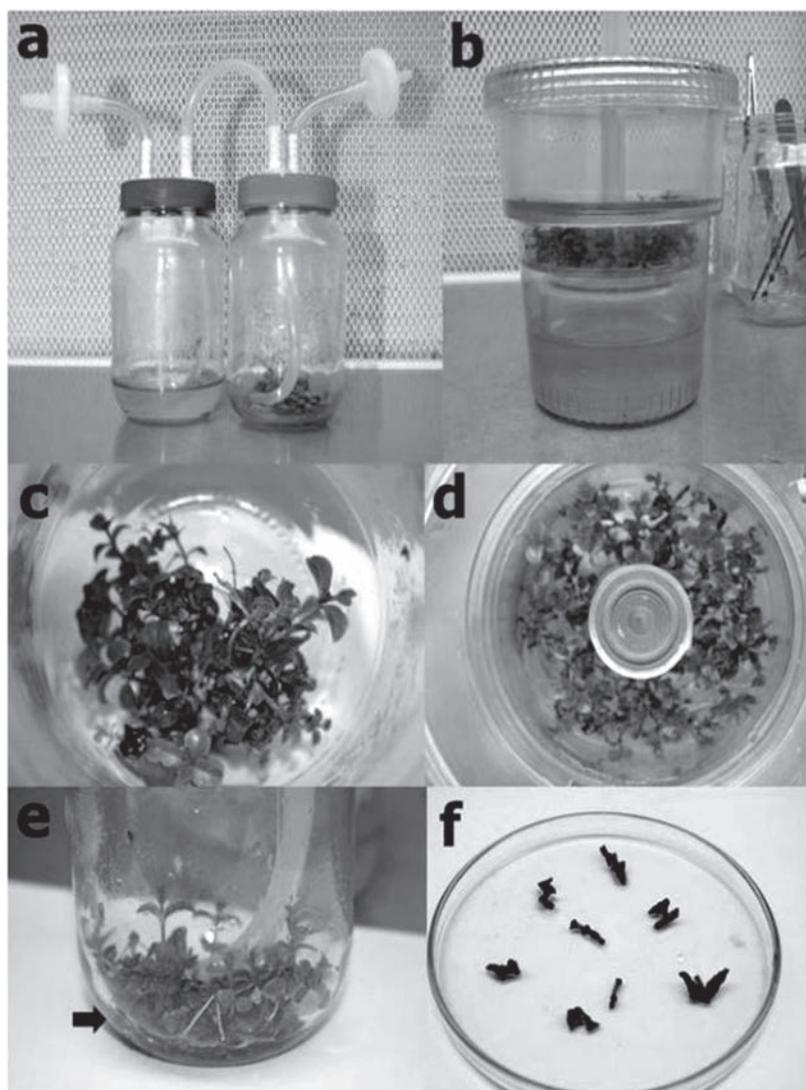
**Tabla 3.** Efecto del Tiempo de inmersión en la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840 en sistemas de inmersión temporal tipo RITA®. NB: número de brotes, ND: número de nudos, CM: coeficiente de multiplicación y LB: longitud de brotes.

Tiempo de inmersión	NB	ND	CM	LB (mm)
1 min	2,85 b	10,04 b	34,37 b	13,21 b
2 min	3,70 a	13,38 a	52,57 a	15,32 a

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente ( $p < 0,05$ ) para la prueba de comparación de medias de Tukey.

En este experimento se observó que con un tiempo de inmersión de 2 min, los valores de las variables estudiadas fueron superiores y estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) a los obtenidos con el tiempo de inmersión de 1 min. Siendo esta tendencia de los resultados similar a la reportada por Gonzalez *et al.*, (2011) quienes encontraron que la tasa de multiplicación de microesquejes de *Eucalyptus globulus* fue significativamente mayor al aumentar el tiempo de inmersión de 1 a 2 minutos. Sin embargo investigadores en otros cultivos han encontrado una reducción en la variables de crecimiento y/o en las tasa de multiplicación a medida que se incrementa el tiempo de inmersión (Basail *et al.* 2013; Vilchez *et al.* 2011). Esto demuestra la necesidad de determinar el tiempo de inmersión para cada una de las especies y fases de cultivo en la micropropagación, pues del ajuste del tiempo de inmersión depende en gran medida la eficiencia del empleo de los Sistemas de Inmersión Temporal (Escalona, 2006; Berthouly y Etienne, 2005).

Las diferencias encontradas en este experimento en la variables evaluadas con respecto al tiempo de inmersión pudieran explicarse debido a que a un ma-



**Figura 1.** Aspecto general de la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840 multiplicándose en sistemas de inmersión temporal: (a) multiplicación en BIT®, (b) multiplicación en RITA®, (c) brotación en BIT®, (d) brotación en RITA®, (e) la flecha negra indica la permanencia de una lámina de medio de cultivo luego de cada inmersión y (f) brotes que crecieron en la lámina de medio de cultivo.

yor tiempo de contacto entre los microesquejes y el medio de cultivo proporciona un mayor suministro de nutrientes y reguladores de crecimiento a los explantes (Santos *et al.*, 2011), lo que puede maximizar su desarrollo (Preil, 2005). Además con cada inmersión el ambiente del recipiente de cultivo es renovado con el fin de eliminar compuestos volátiles tales como etileno (Roels *et al.*, 2006) y promoviendo la recirculación de dióxido de carbono necesaria para la fotosíntesis mejorando aún más el metabolismo autotrófico del carbono en las hojas (Aragón *et al.*, 2014).

El análisis estadístico detectó diferencias para la interacción tiempo y frecuencia de inmersión (tabla 4) en la variable CM. Los mayores valores de CM se consiguieron con la combinación de tiempo y frecuencia de inmersión de 2 min y 3 ó 4 veces al día (51,72 y 62,82,

respectivamente), siendo estos valores superiores a los señalado por De Feria *et al.* (2003) quien reporta un CM de 44,7 utilizando SIT tipo BIT, 20 microesquejes como inoculo inicial y un tiempo y frecuencia de inmersión de 1 min cada 6 h, pero con una renovación y aumento del medio (de 200 mL a 500 mL) de cultivo a los 21 días. Etienne y Berthouly (2002), plantearon que el movimiento de los explantes dentro del recipiente de cultivo durante el momento de la inmersión, elimina en muchos casos la dominancia apical y/o provoca la separación de los explantes, con lo cual se favorece la producción de nuevos brotes y con ello un incremento del CM. Por otra parte, CM decae si la frecuencia de inmersión disminuye, comportamiento también observado en *E. globulus* por Gonzalez *et al.* (2013).

**Tabla 4.** Efecto de la interacción entre el Tiempo y la frecuencia de inmersión en la multiplicación de microbrotes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840 en sistemas de inmersión temporal tipo RITA®. NB: número de brotes, ND: número de nudos, CM: coeficiente de multiplicación y LB: longitud de brotes.

Tiempo de inmersión (min)	Frecuencia de inmersión (veces/día)	CM
1 min	3	35,60 c
1 min	4	33,14 c
2 min	3	51,72 b
2 min	4	62,82 a

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente ( $p < 0,05$ ) para la prueba de comparación de medias de Tukey.

## Conclusiones

El cultivo en sistema de inmersión temporal en la fase de multiplicación favoreció crecimiento y la proliferación de brotes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840. Se determinó que el empleo de sistemas de inmersión temporal tipo RITA® con 3 ó 4 inmersiones al día de 2 min duración mejoró la inducción de brotes y el coeficiente de multiplicación en la fase multiplicación *in vitro*.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia por el financiamiento del Proyecto del VAC-CONDES-CC-00576-10 con el cual se llevó a cabo esta investigación.

## Referencias bibliográficas

Adelberg, J.; Naylor-Adelberg, J.; Tascan M. 2007. Larger Plants From Liquid-Based Micropropagation: A Case Study With *Hydrangea quercifolia* Bartr. 'Sikes Dwarf'. *Combined Proceedings International Plant Propagators Society*. 57:1-10.

Aitken-Christie, J.; Jones, C.; Bond S. 1985. Wet and shoots in radiate pine micropropagation. *Acta Horticulturae*. 166:93-100

Aitken-Christie, J. 1991. Automation. En: Micropropagation. Compilado por: Debergh P.C. y Zimmerman R. H. Firth edition. Dordrecht, The Netherland. pp 358-363. Kluwer Academic Publishers.

Akhtar, N.; Kumari, N.; Pandey, S.; Ara, H.; Singh, M.; Jaiswal, U.; Jain S.M. 2000. Somatic embryogenesis in tropical fruit trees. En: Somatic embryogenesis in woody plants. pp. 93-131. Springer Netherlands.

Albany, N.; Jiménez, E.; Vilchez, J.; García, L.; De Fera, M.; Pérez, N.; Sarría Z., Pérez B.; Clavero, J. 2005. Use of growth retardants for banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine) shoot multiplication in temporary immersion systems. En: Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Compilado por: Hvoslef-Eide A. y Preil W. Firth edition. Dordrecht, The Netherland. pp 213-224. Springer.

Alchanatis, V.; Peleg, K.; and Ziv, M. 1994. Morphological control and mensuration of potato plants from tissue cultures for automated micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 36: 331-338.

Ali, N. R.M.S.; Mulwa, M.A.; Mortan, R.M., Skirvin. 2003. Micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.) *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 78(5): 739-741.

Alvard, D.; Cote, F.; Teisson, C. 1993. Comparison of methods of liquid medium cultures for banana micropropagation: effect of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 32: 55-60.

Amin, M.N.; V.S. Jaiswal. 1988. Micropropagation as an aid to rapid cloning of a guava cultivar. *Scientia Horticulturae*. 36: 89-95.

Amin, MN; Jaiswal, VS 1987 Rapid clonal propagation of guava through *in vitro* shoot proliferation on nodal explants of mature trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 9 (3): 235-243

Amin, MN.; Jaiswal, VS. 1988. Micropropagation as an aid to rapid cloning of guava cultivar. *Scientia Horticulturae*. 36: 89-95

Amin, MN.; Jaiswal, VS. 1989. *In vitro* propagation of guava (*Psidium guajava* L.): effects of sucrose, agar and pH on growth and proliferation of shoots. *Bangladesh Journal Botany*. 18(1): 1-8

Amin, M.N.; Jaiswal, V.S. 1987. Clonal propagation of guava through *In vitro* shoot proliferation on nodal experiments of mature trees. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 9: 235-244.

Aragón, C.; Escalona, M.; Rodríguez, R.; Cañal, M.; Capote, I.; Pina, D.; González-Olmedo, J. 2009. Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 46(1): 89-94.

Aragón, C.; Sánchez, C.; González-Olmedo, J.; Escalona, M.; Carvalho, L.; Amâncio S. 2014. Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during *in vitro* growth and acclimatization. *Biologia Plantarum*. 58(1): 29-38.

Aular, J.; María Casares, M. 2011. Consideraciones Sobre La Producción De Frutas En Venezuela. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - Sp, Volumen Especial*, E. 187-198.

Basail, M.; Medero, V.; Torres, M.; López, J.; Santos, A.; Rayas, A.; Bauta, M.; Beovidez, Y.; Ortega, A. 2013. Nueva alternativa para la micropropagación en inmersión temporal del cultivar de plátano vianda "INIVITPV-2011" (AAB). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 15(1): 98-107

Berthouly, M.; Etienne, H. 2005. Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En: Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. pp 165-195. Springer Netherlands.

Cañizares, D. L.; Puesme R. 2003. Crecimiento y desarrollo del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.) en Santa Bárbara, Estado Monagas, Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola*. 3(1): 34-38.

Castro, D.; González, J. 2002. Eucalyptus (*Eucalyptus grandis* Hill. ex Maiden.) en el sistema de inmersión temporal. *Agricultura Técnica*. 62(1): 68-78.

Choudhury, S.; Sharan, L.; Sinha M. 2013. Pharmacological efficacy of some medicinal plants used for treatment of gastrointestinal diseases. *The Ecoscan 3* (special issue): 111-116.

Concepción, O.; Nápoles, L.; Pérez, A.; Peralta, N.; Trujillo R. 2004. Regeneración de brotes adventicios en hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.) cultivadas *in vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 4(2): 54-61

Cruzat, GR. 2009. Resultados y lecciones en sistema de inmersión temporal en especies anuales, frutales y vides. Proyecto de Innovación en las Regiones Metropolitana, del Maule, del Biobío y de Los Ríos. Chile. Ograma Ltda. p. 37-46. La publicación Resultados y Lecciones en Sistema de Inmersión Temporal en Especies Anuales, Frutales y Vides se encuentra disponible a texto completo en el sitio de FIA en Internet ([www.fia.gov.cl](http://www.fia.gov.cl)), en la sección Banco de Negocios FIA.

Damiano, C.; Gentile, A.; La Starza, S.R.; Frattarelli A.; Monticelli, S. 2003. Automation in micropropagation through temporary immersion techniques. *Acta Horticulturae*. 616: 359-364.

De Fera, M.; Chávez, M.; Quiala, E.; Jiménez, E. 2003. Efecto de la densidad de inóculo y la frecuencia de inmersión en la propagación *in vitro* de *Psidium guajava* cv. Enana roja en sistemas de inmersión temporal. *Biotecnología Vegetal*. 3(3): 149 - 154.

- Escalona, M.; Lorenzo, J.; González, B.; Daquinta, M.; Barroto, C.; González, J.; Desjardines, Y. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Report*. 18(9):743-748.
- Escalona, M. 2006. Temporary immersion beats traditional techniques on all fronts. *Prophyta annual*. 48-50.
- Etienne, H.; Berthouly, M. 2002. Temporary immersion systems in the plant micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 69: 215-231.
- George, E. F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture; Part 1: The Technology. Second Edition. Great Britain, Exegetics Ltd. 574 p.
- Giménez, C.; Colmenares, M. 2004. Sistemas prototipos para la micropropagación por inmersión temporal. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*. 21 Supl. 1: 1-7
- González, R.; Ríos, D.; Avilés, F.; Sánchez M. 2011. Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus globulus* mediante sistema de inmersión temporal. *Bosque*. 32(2): 147-154
- Jackson, MB. 2003. Aeration stress in plant tissue cultures. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*. Special Issue: 96-105.
- Jaiswal, V.S.; Amin, M.N. 1987. *In vitro* propagation of guava from shoot culture mature trees. *Journal Plant Physiology*. 130(1): 7-12.
- Jiménez, E. 2005. Mass propagation of tropical crops. En: Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Compilado por: Hvoslef-Eide A. y Preil W. Firth edition. pp 197-211. Dordrecht, The Netherland. Springer.
- Joseph, B.; Priya, M. 2011. Review on nutritional, medicinal, and pharmacological properties of guava (*Psidium Guajava* Linn.). *International Journal of pharma and bio sciences*. 2: 53-69.
- Litz, R.E.; y Jaiswal, V.S. 1991. Micropropagation of tropical and subtropical fruits. En: Micropropagation. pp 247-263. Springer Netherlands.
- Mallón, R.; Covelo, P. ; Vieitez, A. M. 2012. Improving secondary embryogenesis in *Quercus robur*: application of temporary immersion for mass propagation. *Trees*. 26(3): 731-741.
- Mccown, B.; Lloyd, G. 1981. Woody plant medium (WPM) a revised mineral formulation for micro-culture of woody plant species. *HortScience*. 16:453.
- Meghwal, P. R.; Sharma, H. C.; Singh, S. K. 2010. Micropropagation studies on guava. *Indian Journal of Horticulture*. 67(4): 55-58.
- Mishra, M.; Chandra, R.; Pati, R.; Bajpai A. 2007. Micropropagation of Guava (*Psidium guajava* L.). *Acta Horticulturae*. 735: 155-158.
- Molina, J.; González, J. 2005. Evaluación de dos métodos de micropropagación masal en piña (*Ananas comosus* L. Merr.) variedad Golden. Universidad de el Salvador, El Salvador, disponible en internet: <http://ri.ues.edu.sv/4705/1/13101484-1.pdf>
- Murashige, T; Skoog, F 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 15(3):473-497.
- Ocampo, F.; Nuñez, V.M. 2007. Propagación *in vitro* de (*Psidium guajava* L.) mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 8(1): 22-27.
- Orellana, P. 1998b. Introducción a la propagación masiva. pp 125-133. En: Pérez J. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. 1era edición. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba.
- Peña, H. A.; Díaz, J. A.; Martínez, T. R. 1996. Fruticultura Tropical. 2<sup>da</sup> parte. ICFES. Santa Fe de Bogotá. Colombia. 208 p.
- Pérez, J.; Jiménez, E.; Agramante, D. 1998. Aumento de la eficiencia en la micropropagación. p. 179-190 En: Pérez J. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. 1era edición. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba.
- Posada, L.; Gómez, R; Reyes, M; Alvares, L. 2003. Empleo de los sistemas de inmersión temporal (RITA®) en la propagación de plantas vía organogénesis en caña de azúcar y bananos. *Biotecnología Vegetal*. 3(1):3-8
- Preil, W. 2005 General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. p 1-18. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W (eds) Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation. Springer, Dordrecht.
- Preil W (Ed) Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation. Springer, Dordrecht.
- Quiala, E.; Cañal, M. J.; Meijón, M.; Rodríguez, R.; Chávez, M.; Valledor, L.; Barbón R. 2012. Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 109(2): 223-234.
- Rai, M. K.; Jaiswal, V.S.; Jaiswal U. 2009. Shoot multiplication and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) from nodal explants of *in vitro* raised plantlets. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 17(1):29-38
- Roels, S.; Noceda, C.; Escalona, M.; Sandoval, J.; Cañal, M.; Rodríguez, R.; Debergh, P. 2006. The effects of headspace renewal in a temporary immersion biorreactor on plantain (*Musa AAB*) shoot proliferation and quality. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 84: 138-146.
- Ross, S.; Castillo, A. 2010. Micropropagación de *Achyrocline flacida* (Weinm.) DC. en medios de cultivo líquidos. *Agrociencia (Uruguay)*. 14(1): 1-7.
- Saher, S.; Piqueras, A.; Hellin, E.; Olmos E. 2004. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiologia Plantarum*. 120(1): 152-161.
- Santos, A.; Cabrera, M.; Gómez, R.; López, J.; Rayas, M.; Basail, M.; Beovides, Y. 2011. Multiplicación en sistema de inmersión temporal del clon de malanga "Viequera" (*Xanthosoma* spp.). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 13(2): 97-1
- Scherwinski, J.; De Lucas, G. 2003. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 38 (9): 1035-1043.
- Singh, S.K.; Meghwal, P.R.; Sharma, H.C.; Singh, S.P. 2002. Direct shoot organogenesis on hypocotyls explants from *In vitro* germinated seedlings of *Psidium guajava* L. Cv. Allahabad Safeda. *Scientia Horticulturae*. 95: 213-221.
- Statistix8. 2003. Statistix8: Analytical Software User's Manual. Tallahassee, Florida, U.S.A.
- Steinmacher, D. A.; Guerra, M. P.; Saare-Surminski, K.; Lieberei, R. 2011. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Annals of Botany*. 108(8): 1463-1475.
- Teisson, C. y Alvard, D. 1994. A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: temporary immersion. VII Int. Congress IAPTC, Firenze. *Book of Abstracts*. 25.
- Vento, O.Y. 2011. Instructivo técnico para el cultivo de la guayaba. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Cuba. 44 p. Disponible online: <http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/4330/index.pdf>
- Vílchez, J.; Albany, N.; Martínez, L.; Molina, M.; Pirela, C.; Molina, M.; Alvarez, C. Chirinos, J. 2011 Multiplicación en sistemas de inmersión temporal y enraizamiento *ex vitro* de ocumo blanco (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 13(1): 94-102
- Waghode, S. M. 2014. Antibacterial activity of *Psidium guajava* Linn (guava) leaves extracts on bacterial pathogens. *International Journal of Bioassays*. 3(2): 1794-1796.
- Watt, M. P. 2012. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology*. 11: 14025-14035.
- Wawrosch, C.; Kongbangkerd, A.; Köpf, A. y Kopp B. 2005. Shoot regeneration from nodules of *Charybdis* sp.: a comparison of semisolid, liquid and temporary immersion culture systems. pp. 275-280. En: Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation. Springer Netherlands.
- Ziv, M. 1992. The use of growth retardants for the regulation and acclimatization of *in vitro* plants. Pp 809-817. En: Progress in plant growth regulation. Karssen, C.M.; L.C. Van Loon y D. Vreugdenhil (Eds.). Kluwer Academic Publishers Printed in the Netherlands.
- Ziv, M. 2005. Simple bioreactors for mass propagation of plants. pp 79-94. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W (eds) Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation. Springer, Dordrecht.