

## 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

Manuel de Feria Silva\*, Maité Chávez Milián, Elisa Quiala Mendoza y Elio Jiménez González. \*Autor para la correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: mdeferia@ibp.co.cu

### RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivos estudiar el efecto de la densidad de inóculo y la frecuencia de inmersión en la multiplicación de explantes de guayaba en sistemas de inmersión temporal. Se utilizaron sistemas con recipientes de 1.0 litro de capacidad con 0.2 litros de medio de cultivo. Los mejores resultados se obtuvieron al emplear 20 explantes como densidad de inóculo, con una frecuencia de cuatro inmersiones al día y renovando el medio de cultivo a los 21 días, con lo cual se obtuvo un coeficiente de multiplicación de 44.7 a los 42 días de cultivo. Independientemente de la frecuencia de inmersión empleada se observó la presencia de explantes hiperhidratados, con una menor afectación en los explantes multiplicados en el tratamiento con cuatro inmersiones por día. Con el objetivo de lograr la elongación de los explantes, estos fueron transferidos a sistemas con frascos de 10 litros de capacidad y 3.0 litros de medio de cultivo. Se realizaron cuatro inmersiones por día durante 21 días de cultivo, transcurrido este tiempo el medio de cultivo fue renovado totalmente por 5.0 l de medio de cultivo de enraizamiento. El número de inmersiones se redujo a una por día y se evaluó el efecto de la ventilación forzada sobre la calidad de los explantes obtenidos. Durante la fase de enraizamiento se incrementó el coeficiente de multiplicación (70.3), pero en condiciones de aclimatización sólo se logró la supervivencia de un 21.8% de los explantes producidos en el tratamiento con ventilación forzada.

Palabras clave: automatización, guayaba, medio de cultivo líquido, sistemas de inmersión temporal

### ABSTRACT

The objectives of the present work were to study the effect of the inoculation density and the immersion frequency in the multiplication of guava explants in temporary immersion systems. Systems with flasks of 1.0 liter of capacity with 0.2 liters of culture medium were used. The best results were obtained when 20 explants for flask were inoculated and cultured with a frequency of four immersions a day and after 21 days the culture medium was renovated. After 42 days a multiplication rate of 44.7 was obtained. Hyperhidric explants were observed independently of the immersion frequency with a smaller affectation in the multiplied explants in the treatment with four immersions per day. With the objective of achieving the elongation the explants were transferred to systems with flasks of 10 liters of capacity with 3.0 L of culture medium. They were cultured with four immersions per day during 21 days, lapsed this time the culture medium was renovated totally by 5.0 l of rooting culture medium. The number of immersions decreased to one per day and the effect of forced ventilation in the quality of the obtained explants was evaluated. During the rooting phase the multiplication rate increased (70.3), but under acclimatization conditions the explants survival was only achieved (21.8%) in the treatment with forced ventilation.

Key words: automation, guava, liquid culture medium, temporary immersion systems

### INTRODUCCIÓN

El desarrollo de protocolos basados en el uso de medios de cultivo en estado líquido en algunas o todas las etapas de la micropropagación; puede reducir los costos y la manipulación en la propagación *in vitro* (Teisson y Alvard, 1999; Teisson *et al.*, 1999). Los sistemas de inmersión temporal (SIT) constituyen una tecnología accesible que permite automatizar algunas etapas del cultivo *in vitro* con mayor facilidad para el manejo de los cultivos, su inoculación y cosecha, con lo cual se ahorra tiempo y mano de obra durante el proceso de escalado (Etienne y Berthouly, 2002). Con el empleo de los SIT se logra un aumento en la

eficiencia biológica y productiva del material vegetal propagado y se reducen los efectos colaterales como la hiperhidricidad e hipoxia causados por el cultivo en condiciones estáticas con el empleo de medios de cultivo líquidos (Escalona *et al.*, 1998; Lorenzo *et al.*, 1998; Escalona *et al.*, 1999).

Estas ventajas se deben en lo fundamental a que en los sistemas de inmersión temporal los explantes están en contacto intermitente con el medio de cultivo y esto causa una estimulación en la toma de nutrientes, por tal motivo la mayoría del tiempo los explantes están cubiertos por una fina película de medio de cultivo lo que impide la desecación y por lo tanto, hay poca

resistencia a la difusión de los gases y en consecuencia una mínima interrupción del intercambio de gases entre el explante y la atmósfera. Otros factores que favorecen el crecimiento de los explantes son la frecuencia de inmersión y con ello la renovación de la atmósfera dentro del recipiente a intervalos regulares, con lo cual aumenta el suministro de oxígeno y se elimina la acumulación de gases nocivos en el recipiente de cultivo (Etienne y Berthouly, 2002).

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la frecuencia de inmersión y la densidad de inóculo en la multiplicación *in vitro* de explantes de guayaba con el empleo de sistemas de inmersión temporal como una vía alternativa dentro del esquema de propagación *in vitro* que se ha desarrollado para este cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Condiciones generales de cultivo

Los experimentos se realizaron con sistemas de inmersión formados por recipientes de 1.0 litro de capacidad para la fase de multiplicación y de 10 litros de capacidad para la fase de elongación-enraizamiento.

Como material vegetal se utilizaron explantes multiplicados durante cuatro subcultivos en medio de cultivo en estado semisólido y previo a la inoculación de los SIT los explantes fueron cultivados en medio de cultivo líquido en condiciones agitación durante cinco días.

Los SIT se colocaron en cámaras de cultivo de luz solar con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos que osciló entre 100-125  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y una temperatura de cultivo de  $28 \pm 2.0^\circ\text{C}$ .

### Fase de multiplicación

Se estudió el efecto de la densidad de inóculo y la frecuencia de inmersión sobre la multiplicación de los explantes. Las densidades empleadas fueron 20, 30 y 40 explantes por recipiente de cultivo de 1.0 litro de capacidad. Por cada densidad evaluada se montaron tres SIT y las frecuencias de inmersión fueron cada tres y seis horas, (cuatro y ocho inmersiones por día), con lo cual quedaron conformados un total de seis tratamientos. El tiempo de inmersión fue de un minuto y los recipientes utilizados como reservorio de medio de cultivo fueron esterilizados con 0.2 litros.

Se evaluó a los 42 días el número de explantes por sistema, se calculó el coeficiente de multiplicación, se determinó la altura (cm) de los explantes y de manera visual se evaluó la presencia o no de explantes con síntomas de hiperhidricidad.

A modo de control se prepararon un total de 20 frascos de cristal del tipo biotecnológico (250 ml), cada uno

fue considerado como una réplica y se le colocaron 10 explantes. El medio de cultivo semisólido empleado fue de similar composición al utilizado en los sistemas de inmersión temporal.

Después de los primeros 21 días de cultivo de los explantes en la fase de multiplicación se renovó totalmente el medio de cultivo y se adicionó a cada SIT 0.5 litros de medio de cultivo fresco, el incremento en el volumen con respecto al inicial estuvo directamente relacionado con el desarrollo de los explantes en los recipientes de cultivo.

El procesamiento estadístico de los resultados se realizó mediante la aplicación de un ANOVA de clasificación doble y la prueba de Duncan, mediante el paquete estadístico SPSS para Windows versión 9.0.

### Fase de enraizamiento

Trascurridos 42 días de cultivo en los SIT de 1.0 litro de capacidad, se realizó la transferencia de los explantes a SIT con recipientes de 10 litros de capacidad. A estos sistemas se le añadieron 3.0 litros de medio de cultivo para la elongación de los brotes. Los explantes de los diferentes tratamientos no fueron mezclados al momento de inocular los sistemas de 10 litros, es decir, se les dio seguimiento al comportamiento de estos explantes en dependencia de la densidad de inóculo y la frecuencia de inmersión temporal que se aplicó durante la fase de multiplicación. Los explantes permanecieron durante 21 días con cuatro inmersiones por día con una duración de un minuto cada una. Transcurrido este tiempo se evaluó la altura (cm) de los explantes y la presencia o no de síntomas de hiperhidricidad.

Para el procesamiento estadístico de los resultados se empleó un ANOVA de clasificación simple y la prueba de Duncan.

Después de 21 días de cultivo se renovó todo el medio de cultivo de elongación por 5.0 litros de medio de cultivo de enraizamiento, el incremento en el volumen del medio se debió al desarrollo (altura) alcanzado por los explantes en el recipiente de cultivo.

En esta fase final del proceso y con el objetivo de reducir la presencia de explantes con síntomas de hiperhidricidad y mejorar el desarrollo de los mismos para su aclimatización en condiciones *ex vitro*, se estudió el efecto de la aireación forzada al frasco de cultivo.

Se disminuyó el número de inmersiones de cuatro a una por día y se evaluó después de 28 días de cultivo, el número total de explantes por frasco de cultivo, se calculó el coeficiente de multiplicación, se determinó el número de explantes con raíces, la altura (cm) de los explantes y de manera visual se evaluó la

presencia o no de explantes con síntomas de hiperhidricidad.

En este caso para el procesamiento estadístico de los resultados se empleó un ANOVA doble y la prueba de Duncan.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Fase de multiplicación

Se observó que el mayor número de explantes por sistema de inmersión temporal se obtuvo en el tratamiento inoculado con una densidad inicial de 40

explantes por recipiente de cultivo y cuatro inmersiones al día. Sin embargo, en este tratamiento los explantes alcanzaron una menor altura respecto a los demás (Tabla 1), y presentaron diferencias estadísticamente significativas.

A partir de los resultados obtenidos se seleccionó como mejor tratamiento el inoculado con 20 explantes y cuatro inmersiones al día. Esta decisión se fundamentó en el hecho de que en este tratamiento se obtuvo el mejor coeficiente de multiplicación y la mayor altura de los explantes (Tabla 1), aspecto este último muy importante para el posterior desarrollo de los mismos en la siguiente fase del proceso.

Tabla 1. Efecto de la densidad de inóculo y la frecuencia de inmersión sobre el número de explantes de *Psidium guajava* cv. Enana roja obtenidos después de 42 días de cultivo en sistemas de inmersión temporal con recipientes de 1.0 litro de capacidad.

Tratamientos		(No. de explantes / recipientes de cultivo)	Coeficiente de multiplicación	Altura promedio por tratamiento (cm)
Densidad de Inóculo (No. de explantes / recipientes de cultivo)	Números de inmersiones por día			
20	4	894 d	44.7	4.88 a
30	4	1116 b	37.2	4.38 b
40	4	1356 a	33.9	3.65 c
20	8	716 e	35.8	4.44 b
30	8	1089 c	36.3	4.37 b
40	8	1140 bc	28.5	4.29 b
Control		34 f	3.4	3.17 d
X ± E.S.		906.43 ± 5.691		4.16 ± 0.027

Meias con letras distintas por columnas difieren estadísticamente para  $p < 0.05$  según la prueba Duncan

Este comportamiento puede estar relacionado entre otras causas con la disponibilidad de nutrientes, pues en el tratamiento inoculado con 40 explantes al iniciarse esta fase del proceso, la relación medio de cultivo por explante era de 5.0 ml, mientras que en el tratamiento inoculado con 20 explantes, esta relación fue de 10 ml por explante, lo que permitió una mayor disponibilidad de nutrientes y con ello una mayor estimulación de los explantes a multiplicarse.

Autores como 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 coeficiente de multiplicación. Esta explicación pudo ser otra de las causas que provocó un aumento del coeficiente de multiplicación en el tratamiento inoculado con 20 explantes, pues al inocularse un menor número de explantes por recipiente de cultivo, la agitación que se produce durante el momento en que está siendo aireado el

recipiente de cultivo es mayor y con ello se favorece la posible separación de los explantes. Durante esta fase del proceso de propagación *in vitro* se observó en todos los tratamientos excepto el control, la presencia de explantes con síntomas de hiperhidricidad, no obstante, al evaluar de forma visual este tipo de afectación se observó que en los tratamientos con cuatro inmersiones por día, este tipo de afectación fue menor.

Hussey (1986) demostró que una de las condiciones que reduce las afectaciones por hiperhidricidad en los explantes es el incremento de la aireación, mientras que un año más tarde Aitken-Christie y Jones (1987), explicaron que el contacto intermitente de los explantes con el medio de cultivo en estado líquido también reducía este tipo de afectación. Sin embargo, a pesar de haber combinado estas dos características al trabajar con sistemas de inmersión temporal, no se pudo evitar la presencia de explantes de guayaba con síntomas de hiperhidricidad.

Krueger *et al.* (1991) demostraron la influencia de la frecuencia de inmersión sobre la multiplicación de

brotos y la presencia de explantes con síntomas de hiperhidricidad en fresa, pues con inmersiones de cinco minutos de duración cada 30 minutos tanto el coeficiente de multiplicación como el número de explantes con síntomas de hiperhidricidad se incrementaron. Sin embargo, con inmersiones de cinco minutos cada una hora no hubo presencia de explantes con síntomas de hiperhidricidad, pero el coeficiente de multiplicación disminuyó, por lo que recomendaron emplear la primera combinación durante la fase de multiplicación y la segunda para mejorar la calidad de los explantes con vista a su adaptación en condiciones *ex vitro*. Estos autores observaron, además, que cuando se reduce la frecuencia de inmersión se producen afectaciones en los brotes, sobre todo relacionadas con la desecación de los tejidos, de las

cuales los explantes se recuperan después de un período de tiempo en estas nuevas condiciones.

### Fase de enraizamiento

Al igual que en la fase anterior y a pesar de haber reducido las inmersiones a cuatro por día para todos los tratamientos, se observó después de 21 días de cultivo la presencia de explantes con síntomas de hiperhidricidad.

Al evaluar la altura de los explantes los mejores resultados (6.24 cm) se alcanzaron en el tratamiento inoculado con 20 explantes, el cual presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto a los demás tratamientos (Tabla 2).

Tabla 2. Comportamiento de explantes de *Psidium guajava* cv. Enana roja después de 21 días de cultivo para su elongación en recipientes de 10 litros de capacidad con cuatro inmersiones diarias de un minuto de duración cada una en sistemas de inmersión temporal.

Densidad de Inóculo (No. de explantes / recipientes de cultivos)	Números de inmersiones por día	Altura promedio de los explantes (cm)
20	4	6.24 a
30	4	5.61 bc
40	4	4.92 d
20	8	5.75 b
30	8	5.53 c
40	8	5.40 c
	Control	3.51 e
	X ± E.S.	5.28 ± 0.023

Medias con letras distintas por columnas difieren estadísticamente para  $p < 0.05$  según la prueba Duncan

Después de 28 días de cultivo en fase de enraizamiento se observó que el coeficiente de multiplicación se incrementó en todos los tratamientos con respecto al coeficiente alcanzado en cada uno de ellos durante la fase de multiplicación. El aumento más notable correspondió al tratamiento

inoculado con 20 explantes, con un coeficiente de multiplicación de 70.3 (Tabla 3).

Esto se debió a la formación de nuevos brotes a partir de las yemas localizadas en la base de cada par de hojas (Figura 1).

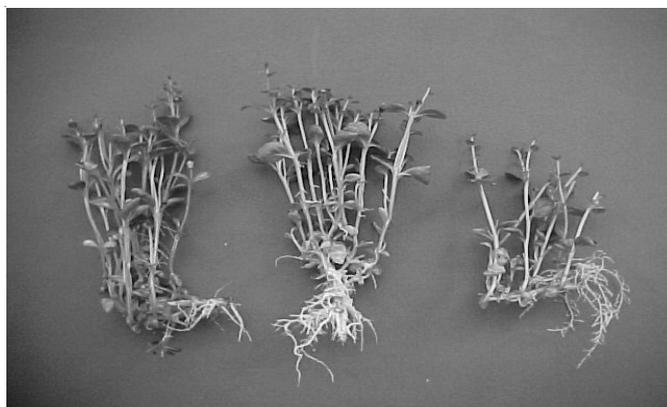


Figura 1. Desarrollo de explantes de *Psidium guajava* cv. Enana roja obtenidos en fase de enraizamiento después de 28 días de cultivo en SIT con recipientes de 10 litros de capacidad, se puede observar la formación de nuevos explantes a partir de las yemas localizadas en la base de cada par de hojas con lo cual se incrementó el coeficiente de multiplicación.

Este comportamiento de los explantes permite individualizarlos a la hora de transplantarlos a condiciones *ex vitro* y obtener con ello un mayor número de plantas.

Los mejores resultados en cuanto al número de explantes por recipiente de cultivo siguieron

correspondiendo al tratamiento inoculado con 40 explantes, con un total de 1796 explantes. Sin embargo, los mejores resultados en cuanto a la altura y el porcentaje de explantes enraizados correspondieron al tratamiento inoculado con 20 explantes.

Tabla 3. Comportamiento de explantes de *Psidium guajava* cv. Enana roja después de 28 días de cultivo en fase de enraizamiento y en recipientes de 10 litros de capacidad con una inmersión diaria de un minuto de duración cada una y bajo la aplicación o no de ventilación forzada al recipiente de cultivo en sistemas de inmersión temporal.

Tratamientos	Ventilación forzada	No. de explantes / medio de cultivo	Coeficiente de multiplicación	Explantes con raíces		Altura promedio por tratamiento (cm)
				No.	%	
A	Si	1406 d	70.3	1328 d	94.5	7.57 a
B	Si	1636 c	54.5	1523 b	93.1	6.91 b
C	Si	1796 b	44.9	1617 a	90.0	6.13 c
D	No	1221 e	61.0	1008 e	82.5	7.02 b
E	No	1603 c	53.4	1471 c	91.7	6.87 b
F	No	1852 a	46.3	1598 a	86.3	6.81 b
	Control	13 f	1.3	13 f	100.0	4.92 d
	X ± E.S.	1361.0 ± 4.582		1222.5 ± 5.023		6.60 ± 0.032

Medias con letras distintas por columnas difieren estadísticamente para  $p < 0.05$  según la prueba Duncan

Estos resultados pueden estar relacionados con el hecho de que todos los tratamientos evaluados durante la fase de multiplicación se subcultivaron íntegramente, a frascos de 10 litros y el volumen de medio de cultivo fue el mismo para todos, por lo que hubo una mayor disponibilidad de medio de cultivo para los explantes provenientes del tratamiento inoculado inicialmente con 20 explantes.

Se observó además, que en todos los tratamientos independientemente de la aplicación o no de ventilación forzada al recipiente de cultivo, los explantes obtenidos presentaron en mayor o menor medida síntomas de hiperhidricidad, estos fueron menos evidentes en los explantes obtenidos en los tratamientos con ventilación forzada.

Durante la aclimatización de estos explantes, únicamente se logró supervivencia (21.8%) en los que provenían del tratamiento con ventilación forzada.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo corroboraron la importancia de parámetros de cultivo como la frecuencia de inmersión y la densidad de inoculación en la multiplicación *in vitro* de explantes de guayaba con el empleo sistemas de inmersión temporal. Se demostró, además, que la aplicación de ventilación de manera forzada al recipiente de cultivo reduce las afectaciones de

los explantes por hiperhidricidad y favorece la posterior aclimatización en condiciones *ex vitro* de las plantas producidas *in vitro*.

## REFERENCIAS

- Aitken-Christie J y Jones C (1987) Towards automation: radiate pine shoot hedges *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 8: 185–196
- Escalona M, Lorenzo JC, González B, Daquinta M, Fundora Z, Borroto CG, Espinosa D, Arias E y Aspiolea ME (1998) New system for *in vitro* propagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr). *Pineapple News* 5: 5–7
- Escalona M, Lorenzo JC, González B, Daquinta M, González JL, Desjardins Y y Borroto CG (1999) Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Report*, 18: 743–748
- Etienne H y Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 54: 197–200
- Hussey G (1986) Problems and prospects in the *in vitro* propagation of herbaceous plants. En: Withers LA y Alderson PG (eds) *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications* pp 69–84. Butterworths, Boston
- Krueger S, Robacker C y Simonton W (1991) Culture of *Amelanchier × grandiflora* in a programmable micropropagation apparatus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 27: 219–226
- Lorenzo JC, Gonzalez BL, Escalona M, Teisson C, Espinosa P y Borroto C (1998) Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 54: 197–200

Teisson C y Alvard D (1999) *In vitro* production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. *Potato Res.* 42: 499–504

Teisson C, Alvard D, Lartaud M, Etienne H, Berthouly M, Escalona M y Lorenzo JC (1999) Temporary immersion for

plant tissue culture. En: *Plant Biotechnology and In vitro Biology in the 21<sup>st</sup> Century*, Proceedings of the IXth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Section H: Novel micropropagation methods, pp. 629–632. Jerusalem