

## ARTÍCULO CIENTÍFICO

Fabiola Ocampo<sup>1</sup> y Víctor Manuel Núñez<sup>2</sup>

## ABSTRACT

***In vitro* propagation of *Psidium guajaba* using direct organogenesis from nodal segments**

Multiple shoots were induced using direct organogenesis from nodal segments of 10 different genotypes of guayaba. For this an *in vitro* clonal propagation system combined with rapid *ex vitro* induction of shoots was established in order to propagate elite trees. The use of nodal segments resulted in adventitious shoots adequate for mass multiplication in less time. The *in vitro* response of the genotypes was evaluated using the culture media MS (Murashige and Skoog, 1962), Mc (Mascarenhas) and WPM (Woody Plant Medium) supplemented with 0.1 mg·L<sup>-1</sup> of indole acetic acid (IAA) and 0.25 mg·L<sup>-1</sup> of benzoaminopurine (BAP). The procedure for sterilizing with sodium hypochlorite effectively prevented the contamination of the explants after the inoculation of the culture medium. The greatest percentage of shoot induction was achieved with 0.25 mg·L<sup>-1</sup> of BAP. The nodal segments showed between 1-2 adventitious shoots per explant 15 days post-inoculation and 3-7 shoots 30 days post-inoculation. Once individualized, the shoots were used in a new mass multiplication phase in which four different substrates were tested during rooting and hardening. This methodology permitted the *in vitro* propagation of guayaba four weeks post-inoculation. The best results were achieved with the WPM medium that resulted in the first rooted plantlets two weeks after the transfer to the rooting substrate.

**Key words:** Organogenesis, nodal segments, adventitious shoots, Murashige and Skoog, Woody Plant Medium, Mascarenhas, rooting phytohormones, benzoaminopurine, indole acetic acid.

Recibido: febrero 21 de 2007  
Aceptado: junio 2 de 2007

1. Investigadora profesional asociada, Laboratorio de Genética Molecular Vegetal, Centro de Biotecnología y Bioindustria, C.I. Tibaitatá, Mosquera (Cundinamarca), CORPOICA.
2. Investigador principal asociado, Laboratorio de Genética Molecular Vegetal, Centro de Biotecnología y Bioindustria, C.I. Tibaitatá, Mosquera (Cundinamarca), CORPOICA.  
e-mail: vnunez@corpoica.org.co

## Propagación *in vitro* de *Psidium guajaba* mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales

## RESUMEN

Se indujeron múltiples brotes mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales de 10 genotipos diferentes de guayaba. Para ello se estableció un sistema de propagación clonal *in vitro* combinado con inducción rápida de brotes *ex vitro* para propagar árboles élite. La utilización de segmentos nodales permitió obtener en poco tiempo brotes adventicios adecuados para multiplicación masiva. La respuesta *in vitro* de los genotipos fue evaluada usando los medios de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), Mc (Mascarenhas) y WPM (*Woody Plant Medium*) suplementados con 0,1 mg·L<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA) y 0,25 mg·L<sup>-1</sup> de bencilaminopurina (BAP). El procedimiento de desinfección con hipoclorito de sodio previno eficientemente la contaminación de los explantes después de la inoculación en el medio de cultivo. El mayor porcentaje en la inducción de brotes se logró con 0,25 mg·L<sup>-1</sup> de BAP. Los segmentos nodales presentaron de 1 a 2 brotes adventicios por explante después de 15 días de inoculados y de 3 a 7 brotes a los 30 días después del inicio del cultivo. Una vez individualizados los brotes se usaron en una nueva fase de multiplicación masiva en la que se probaron cuatro sustratos diferentes durante el enraizamiento y el endurecimiento. Esta metodología permitió la propagación *in vitro* de guayaba cuatro semanas después del inicio del cultivo. Los mejores resultados se lograron con el medio WPM que permitió obtener las primeras plántulas enraizadas dos semanas después de la transferencia al sustrato de enraizamiento.

**Palabras clave:** organogénesis, segmentos nodales, brotes adventicios, Murashige y Skoog, *Woody Plant Medium*, Mascarenhas, enraizamiento, hormonas vegetales, bencilaminopurina, ácido indolacético.

## INTRODUCCIÓN

LA GUAYABA (*PSIDIUM GUAJABA* L.) es una especie frutícola originaria de América Ecuatorial que se encuentra ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales para su consumo fresco y procesado (Martin, 1984). Es la más cultivada de las especies del género *Psidium* que pertenecen a la familia de las mirtáceas, por su alto contenido nutricional, propiedades medicinales y su valor agroecológico (Yadava, 1994; Peña, Díaz y Martínez, 1996). La fruta posee niveles de vitamina C que alcanzan los 400 mg por cada 100 gramos de pulpa, alto contenido de pectina y minerales. Estas bondades nutricionales acompañadas de alto consumo fresco hacen de esta fruta muy apetecida en los mercados de varios países por lo que se le considera como la ‘manzana del trópico’ (Prakash, Narayana-Swamy y Sondur, 2002). En Colombia la fruta es muy común a lo largo y ancho del país; sin embargo, el cultivo no cuenta con un desarrollo planificado y sistematizado por falta de investigación. Por lo tanto, presenta muchos limitantes que inciden directamente en la producción y calidad

de la fruta. Dentro estos problemas, el ataque de los insectos y el desconocimiento del impacto de los métodos de propagación y la maduración rápida de la fruta, se consideran como factores limitantes críticos que deben ser abordados mediante la generación de paquetes tecnológicos apropiados que contribuyan a la sostenibilidad de las plantaciones con enfoque comercial. La fruta, como producto primario, tiene un gran potencial a nivel agroindustrial pero requiere de investigación en cosecha y poscosecha.

La propagación de la guayaba se realiza especialmente por medio de semilla sexual y en menor escala a través de acodos y estacas (Jaiswal y Amin, 1992). La propagación masiva por semilla, aunque es fácil, genera alta variabilidad y baja producción comercial (Pereira, Pretecher y Benincasa, 1990; Ali *et al.*, 2003). Por su parte, la propagación asexual convencional por lo general es poco eficiente y difícil de masificar en niveles deseables. En Colombia, la propagación masiva se hace por semilla y la mayoría de las explota-

ciones comerciales se derivan de injertos convencionales y de estacas enraizadas.

Se ha demostrado la posibilidad de propagar *in vitro* la guayaba en varios estudios utilizando ápices (Papadadatos y Pontikis, 1990), segmentos nodales (Amin y Jaiswal, 1988; Mohamed-Yasseen *et al.*, 1995), hojas jóvenes (Kosky, comunicación personal), hipocotilos (Loh y Rao, 1989; Singh *et al.*, 2002) y embriogénesis somática (Vilchez *et al.*, sin publicar; Manoj, Akhtar y Jaiswal, 2007). Kaundal y Deol (1990), compararon el desarrollo de grupos de yemas con un anillo modificado de yemas durante dos años, con éxito muy bajo. Prasad, Rabbani y Ram (1988) lograron un 80% de prendimiento aplicando calor y auxinas a la base de los cortes. Mohamed-Yassen *et al.* (1995), cultivaron nudos de plántulas de semillas germinadas en medio MS suplementado con bencilaminopurina (BAP) y lograron producir brotes con enraizamiento. Singh *et al.* (2002) informaron sobre la obtención de plantas a partir de hipocótilos con una frecuencia muy baja. Recientemente, Vilchez *et al.* (sin publicar) y Manoj, Akhtar y Jaiswal, (2007) señalan que obtuvieron exitosamente plantas completas mediante embriogénesis somática.

En la actualidad, el establecimiento y estandarización de protocolos *in vitro* con tejidos de alta respuesta de regeneración en especies leñosas se considera fundamental para procesos de micropropagación masiva y para facilitar la tecnología de transformación genética. En varias especies frutales y forestales se han hecho estudios para obtener plantas *in vitro* por medio de organogénesis indirecta (Pérez-Tornero *et al.*, 2000) y por embriogénesis somática (Toribio *et al.*, 2004). Investigaciones efectuadas por Loh y Rao (1989), Amin y Jaiswal (1988), Ramírez y Salazar (1997), Pérez-Tornero *et al.* (2000) indican que la propagación *in vitro* de guayaba por brotes adventicios es posible. Sin embargo, aún no existen estudios que demuestren los efectos de la micropropagación en plantaciones comerciales.

En Colombia, el cultivo *in vitro* puede ser utilizado para apoyar programas de mejoramiento genético, para propagar árboles élite evaluados y seleccionados en diferente regiones, y para reemplazar plantaciones comerciales derivadas

de semillas. El objetivo de este trabajo fue establecer una metodología de propagación *in vitro* para implementar una tecnología de micropropagación de guayaba. Por lo tanto, informamos sobre la inducción directa *in vitro* de brotes a partir de segmentos nodales y la inducción rápida de brotes en plantas regeneradas en condiciones de invernadero

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Para desarrollar la técnica de organogénesis directa se utilizaron segmentos nodales de *Psidium guajaba* tomados a partir de dos fuentes de explantes; se utilizaron plántulas de invernadero de 60 días de germinadas y procedentes de semilla de varias accesiones de la colección presente en el banco de germoplasma de guayaba, así como plantas de vivero de 180 días provenientes de la Estación Experimental (E.E.) CIMPA de CORPOICA, en el municipio de Barbosa (Santander). De las plántulas de invernadero se cortaron segmentos de tallo del sexto piso foliar y de las plantas de vivero se tomaron segmentos de ramas jóvenes (Figura 1).

Los segmentos de tallos de plántulas y ramas jóvenes de plantas de vivero se colocaron en una solución de 0,5% de polivinilpirrolidona durante 5 minutos o durante el tiempo en que duró la toma de la muestra. Los explantes fueron superficialmente desinfectados en condiciones de asepsia una cámara de flujo laminar. Debido a que en experimentos preliminares la contaminación de los explantes fue del 100%, en este estudio se probaron dos formas de desinfección superficial. La primera consistió en sumergir los explantes en una solución de hipoclorito de sodio del 5% (p/v) con 2-3 gotas de Tween 20, durante 10 minutos, seguido de cuatro enjuagues en agua destilada estéril. La segunda forma utilizó una solución de bicloruro de mercurio de 0,05% durante 2 minutos y cinco enjuagues con agua destilada estéril.

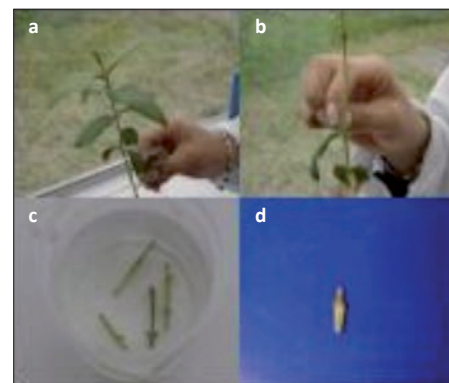
Para determinar la inducción y desarrollo de brotes, cada segmento de tallo o rama superficialmente desinfectado fue seccionado de acuerdo con la cantidad de segmentos nodales presentes. Se tomaron explantes nodales de aproximadamente 1 cm de longitud con un solo nudo (Figura 1d). Cada explante con nudo fue colocado

en los medios de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), Mc (George, Puttock y George, 1982) y WPM (*Woody Plant Medium*, Lloyd and McCown, 1980) suplementados con 0,1 mg·L<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA) y 0,25 mg·L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP), 15% y 30% de sacarosa. Los medios con un pH ajustado de 5,8, se esterilizaron con autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión y 121°C. Para la solidificación de los medios se utilizó gelrite al 2%.

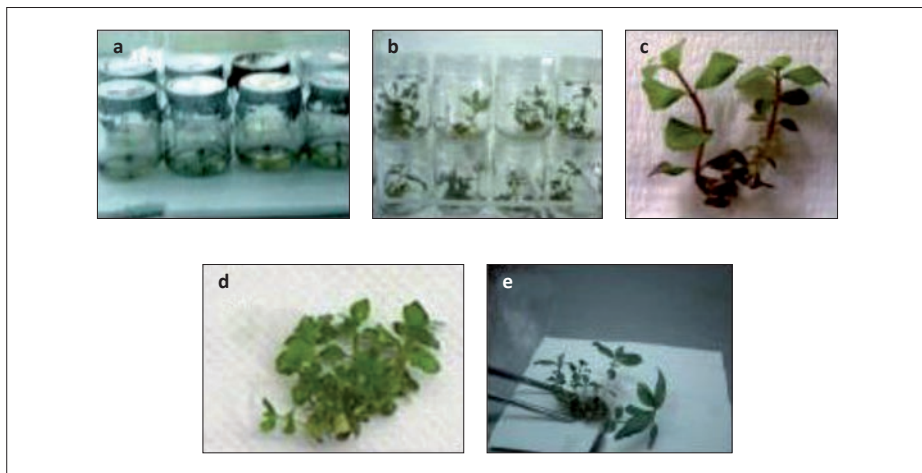
El establecimiento de los explantes se realizó bajo condiciones de estricta asepsia utilizando para ello una cámara de flujo laminar previamente acondicionada. Los explantes fueron establecidos en frascos de compota con 10 mL de medio de cultivo sólido. Después de una semana los segmentos nodales se pasaron al mismo medio de cultivo en estado líquido con agitación permanente de 80 rpm y se incubaron a 26 ± 2°C, con un fotoperiodo de 16 horas luz para la fase de inducción de brotes.

Una vez alcanzaron alrededor de 5 cm, los brotes inducidos en el medio líquido fueron individualizados y sementados para realizar una nueva fase de multiplicación a partir de yemas axilares bajos las mismas condiciones iniciales de inducción (Figura 2).

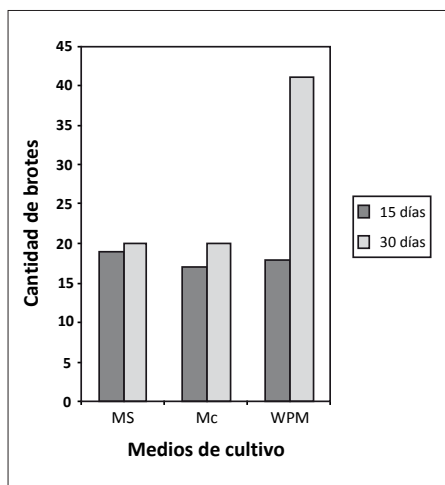
Después de la fase de multiplicación los brotes obtenidos fueron nuevamente individualizados y llevados a la fase de enraizamiento. Para este proceso se utilizaron tubos de ensayo de 15 cm x 2,5 cm en cuatro tratamientos diferentes. Para el tratamiento con agua se tomó agua corriente de la llave



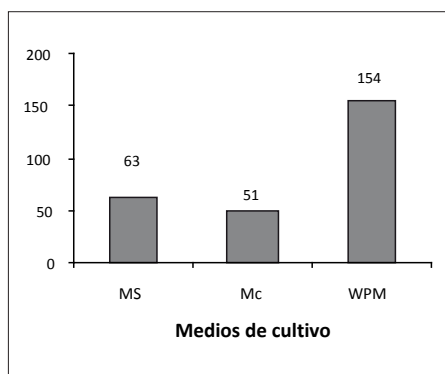
**Figura 1.** Procedimiento para la preparación de explantes: a) Ramas jóvenes; b) deshoje de tallo; c) desinfección superficial y d) nudo aislado.



**Figura 2.** Producción brotes adventicios a partir de nudos: a) segmentos nodales inoculados en medio de cultivo. b y c) brotes inducidos en medio líquido después de 15 días de la siembra de los explantes. d) brotes múltiples a los 30 días después de la siembra de los explantes primarios. e) individualización de brotes múltiples para una nueva multiplicación.



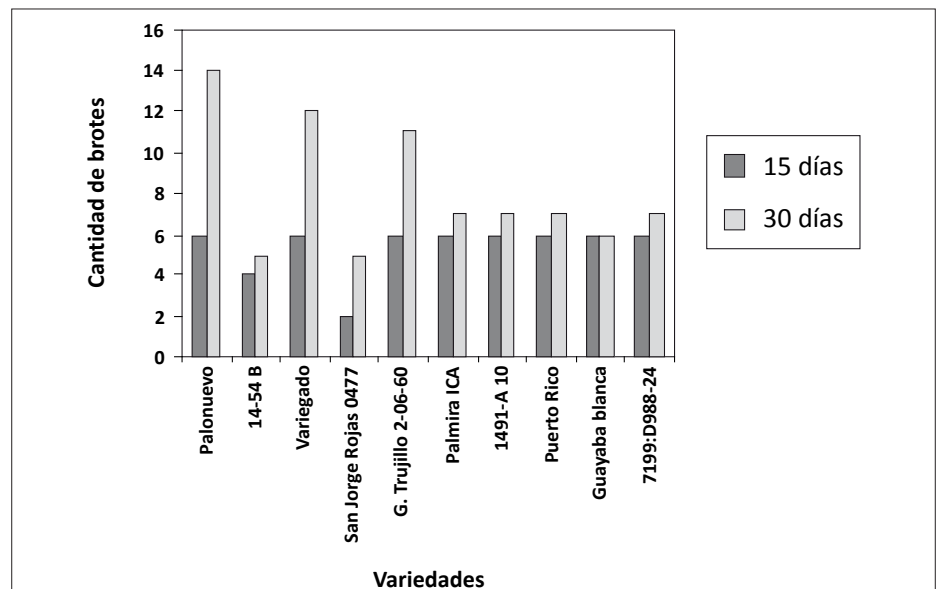
**Figura 3.** Cantidad de brotes de *Psidium guajaba* producidos a 15 y 30 días de inoculados en los tres medios de cultivo probados: MS (Murashige y Skoog), Mc (Mascarenhas), WPM (Woody Plant Medium).



**Figura 4.** Cantidad de nudos producidos de *Psidium guajaba* en los tres medios de cultivo utilizados, 30 días después del establecimiento del cultivo.

colocando 2 mL por tubo; para el tratamiento con Activol® se usaron 2 mL por tubo una solución del 20% (P/V); para el tratamiento con bagazo de caña sin lavar y bagazo de caña lavado se tomaron 2 gramos por tubo. El bagazo de caña se obtuvo de un trapiche experimental de CORPOICA en la E.E. CIMPA el cual fue molido y lavado en agua destilada para uno de los tratamientos. Cada tratamiento consistió de 36 réplicas a las cuales se les tomaron datos de cantidad y tamaño de las raíces producidas a los 15 y a los 30 días de iniciado el experimento.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar y los resultados se evaluaron mediante el análisis estadístico



**Figura 5.** Cantidad de brotes producidos con los diferentes genotipos probados.

de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para establecer la dependencia entre las variables a analizar, la respuesta del genotipo a la inducción de brotes, el efecto del medio de cultivo en la inducción de brotes y el grado de enraizamiento de los brotes inducidos. Para la fase de enraizamiento se utilizó también un diseño experimental completamente al azar y los datos obtenidos se sometieron al análisis de varianza (ANAVA) con la prueba de Tukey para determinar las posibles diferencias entre los tratamientos.

## RESULTADOS

El material vegetal crecido en invernadero respondió al protocolo de desinfección superficial aplicado con resultado de cero contaminación en todos los explantes inoculados. Se optó por utilizar el proceso de desinfección superficial con hipoclorito de sodio puesto que es de fácil manejo y no fue tóxico para el material de siembra utilizado.

En un experimento preliminar a pequeña escala (datos no mostrados) se cultivaron segmentos nodales en tres medios suplementados con 0,1, 0,25, 0,75 y 1,0 mg·L<sup>-1</sup> de BAP. Los resultados indicaron que la mejor respuesta en la inducción de brotes se logró con 0,25 mg·L<sup>-1</sup> de BAP y, por lo tanto, esta concentración fue la seleccionada para desarrollar el estudio de la respuesta de diferentes genotipos en relación con la influencia de las sales basales de los medios utilizados. En general, en todos los trata-

mientos, los nudos respondieron con una inducción promedio de 1 a 2 brotes adventicios por explante, después de 15 días de inoculados (Figuras 2b y c) y de 3-7 brotes a los 30 días después del inicio del cultivo (Figura 2d). Los brotes se individualizaron y a la vez fueron utilizados para una nueva fase multiplicación (Figura 2e).

La producción de brotes adventicios a los 15 y 30 días de cultivo (Figura 3), así como el número de nudos a los 30 días de cultivo (Figura 4), variaron con el tipo de medio utilizado en una segunda fase de propagación *in vitro*.

Los genotipos respondieron de diferentes maneras a las condiciones de cultivo *in vitro* en relación con la producción de brotes y de nudos (Figuras 5 y 6). Este resultado indica la relación entre la respuesta *in vitro* y el genotipo. El análisis de los datos con Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) mostró una relación o dependencia entre las variables de estudio (variedades y medios de cultivo) para la producción del número de nudos en los brotes inducidos. En cuanto a la producción de brotes no se encontró dependencia entre los medios de cultivo y los genotipos probados.

La respuesta al enraizamiento en los cuatro sustratos fue notoriamente diferente como se observa en la Figura 7. Los cuatro tratamientos produjeron diferentes cantidades y tamaños de raíces. La cantidad de raíces a los 30 días de cultivo para el sustrato agua fue de 93 raíces, para Activol® de 47 raíces, para bagazo de caña lavado 75 raíces y para bagazo de caña sin lavar de 77 raíces (Figura 8). El tratamiento con agua presentó un 100% de brotes con raíces; el tratamiento con solución de Activol® presentó un 80,55% de brotes con raíces; el tratamiento con bagazo de caña lavada

presentó un 63,88% de brotes con raíces y el tratamiento con bagazo de caña sin lavar presentó un 61,11% de brotes con raíces (Figura 9). En cuanto al tamaño promedio de raíces a los 30 días, para agua se obtuvo un promedio de longitud de raíz de 2,57 cm, para Activol® un promedio de 1,63 cm, para bagazo de caña lavado un promedio de 1,48 y para bagazo de caña sin lavar un promedio de 1,41 cm (Figura 10).

Las plántulas enraizadas se transfirieron a condiciones de invernadero para su endurecimiento (Figura 11). La prueba estadística mostró diferencias significativas entre tratamientos, lo que se corroboró con la prueba de Kruskal Wallis la cual también mostró diferencias significativas entre los tratamientos, siendo agua el mejor tratamiento en cuanto a longitud y cantidad de raíces.

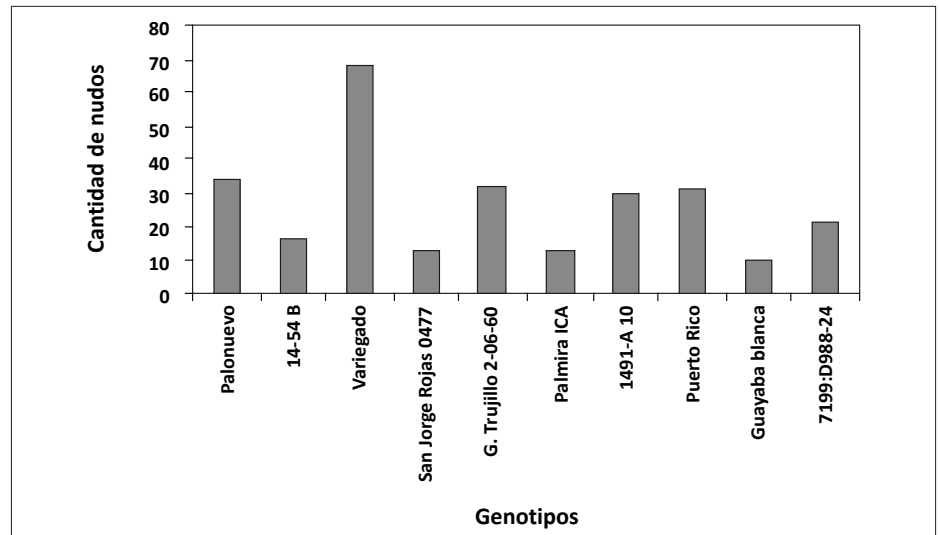


Figura 6. Cantidad de nudos producidos con los diferentes genotipos probados.

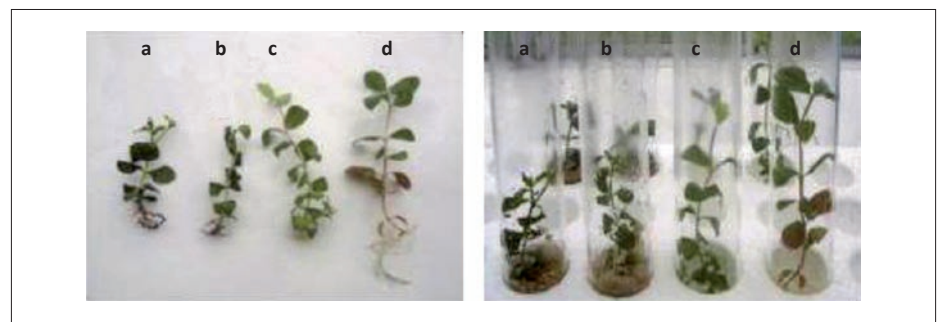


Figura 7. Respuesta de enraizamiento de brotes en cuatro sustratos diferentes. Izquierda, brotes en proceso de enraizamiento. Derecha, brotes enraizados individualizados de acuerdo con los tratamientos. a) Bagazo de caña sin lavar; b) bagazo de caña lavado; c) solución de Activol®; d) agua.

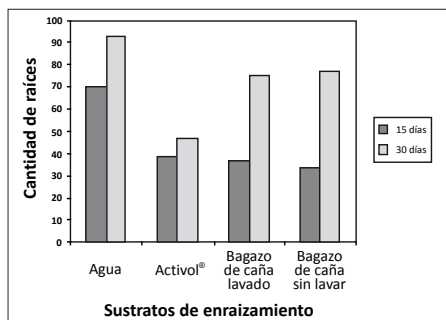


Figura 8. Cantidad de raíces producidas en cada uno de los cuatro sustratos de enraizamiento a los 30 días de iniciado los tratamientos.

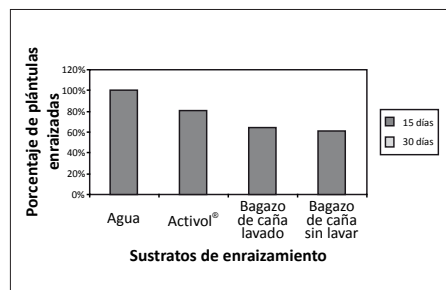


Figura 9. Porcentaje de plántulas enraizadas de *Psidium guajaba* en cuatro sustratos diferentes de enraizamiento a los 15 y 30 días después de iniciado los tratamientos.

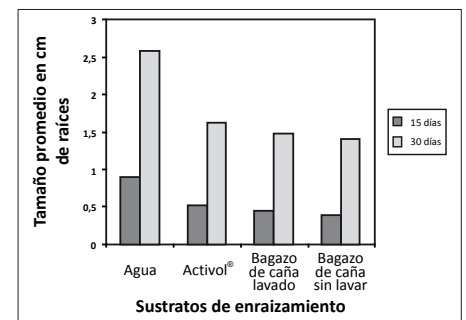


Figura 10. Tamaño de raíces producidas en cada uno de los cuatro sustratos de enraizamiento a los 15 y 30 días de iniciados los tratamientos.



**Figura 11.** Fase de endurecimiento de plántulas producidas *in vitro*: a) inicio del proceso de adaptación de plántulas a condiciones de invernadero; b) plántulas completamente adaptadas a condiciones *ex vitro* en invernadero.



**Figura 12.** Inducción de brotes adventicios a partir de plantas obtenidas *in vitro* y endurecidas en invernadero: a) eliminación de dominancia apical y crecimiento de brotes a partir de yemas axilares; b) brotes enraizados listos para transferir a suelo.

Las plantas endurecidas y con una altura de 30-40 centímetros se utilizaron para inducción de brotes a partir de yemas axilares presentes a lo largo del tallo, como se ilustra en la Figura 12a. Estos brotes se aislaron del tallo y se sometieron a enraizamiento en agua durante dos semanas, para luego ser transferidos a potes con suelo en condiciones de invernadero. Todos los brotes inducidos de crecimiento ortotrópico presentaron un sistema radicular vigoroso lo que permitió una adaptación rápida a suelo.

## DISCUSIÓN

En varios estudios previos se indica la dificultad de obtener material aséptico de guayaba para el cultivo *in vitro* (Ramírez, León y Urdaneta, 1999), lo que significa que la desinfección superficial es a menudo un factor limitante para el establecimiento *in vitro*. El protocolo de desinfección superficial utilizado en este estudio arrojó resultados óptimos con material donante procedente de invernadero, posiblemente por tener menos carga microbiana. Estudios realizados por Ramírez, León y Urdaneta,

(1999), con material colectado en campo mostraron baja eficiencia en cuanto a la eliminación de microorganismos contaminantes. En este trabajo se experimentaron problemas similares con el material de campo; sin embargo, utilizando el bicloruro de mercurio al 0,1% se pudo lograr un buen porcentaje de asepsia que permitió iniciar un cultivo *in vitro* con un número aceptable de explantes limpios.

Aunque el análisis estadístico no muestra una dependencia altamente significativa entre los genotipos de guayaba y los medios de cultivo probados en la producción de brotes adventicios a los 15 y a los 30 días de cultivo, se puede observar en la Figura 3 que el medio WPM presenta mayor número de brotes a los 30 días. Esto sugiere que el tipo de sales del medio basal tiene una influencia directa en la inducción de brotes. Igualmente, como lo señala la Figura 4, en la producción de nudos por brote el medio WPM es también el medio con mejor respuesta. Esto confirma que efectivamente el WPM es adecuado para cultivo *in vitro* de especies leñosas. Sin embargo, estos resultados contrastan con estudios realizados

con el medio WPM para la propagación *in vitro* de varias especies de algunas plantas leñosas como *Ulmus glabra* (Birosiková *et al.*, 2004) y *Taxus bacatta* (Majada, Sierra y Sánchez, 2000) en los que la respuesta no fue muy alta. Además, se observó que los genotipos Palonuevo y Variegado tuvieron los índices más altos en cuanto a producción de brotes y de número de nudos indicando que la respuesta *in vitro* es genotipo dependiente.

Para la fase de enraizamiento *in vitro* se probaron sustratos diferentes a las fitohormonas usualmente utilizadas como el ácido indolacético, el ácido indolbutírico, el ácido diclorofenoxiacético y el ácido naftalenacético, con el fin de obtener un método simple y barato. Con los cuatro sustratos probados se observó que el agua como sustrato de enraizamiento resultó en un 100% de plántulas enraizadas presentando mayor tamaño y cantidad de raíces por plántula a los 15 y 30 días. En este sentido el agua como tratamiento para enraizamiento es ideal, primero porque es barato y segundo porque induce el desarrollo de un buen sistema radicular. Los tratamientos con la solución de Activol®, bagazo de caña lavado y bagazo de caña sin lavar presentaron porcentajes más bajos de plántulas enraizadas, como se muestra en la Figura 8. Los resultados con estos tratamientos sugieren que el proceso de enraizamiento en guayaba con agua puede ser debido a la presencia de auxinas endógenas en concentración suficiente en los tejidos de las plantas jóvenes y que los otros sustratos de alguna manera pueden inhibir su acción. Ali *et al.* (2003) sugieren que el enraizamiento en guayaba depende de la edad de la planta. En otros estudios en guayaba, Prasad y Rabhani (1988), Pereira, Petrechen y Benincasa, (1991) utilizaron auxinas exógenas para enraizamiento de estacas con nudos, logrando buen enraizamiento. Sin embargo, Ali *et al.* (2003) indica que aunque se puede lograr enraizamiento con auxinas endógenas, el costo es alto. De acuerdo a nuestro conocimiento, es la primera vez que en una especie leñosa, específicamente en guayaba, se utilizan estos sustratos para inducir enraizamiento de plantas *in vitro* y *ex vitro* a nivel de laboratorio y campo.

La etapa posterior al endurecimiento de las plantas en invernadero consistió en inducir brotes en condiciones de invernadero a partir de las plántulas propagadas y

enraizadas previamente en condiciones *in vitro*. Esto se hizo con el objetivo de complementar la fase *in vitro* de manera que apoye procesos de escalamiento a nivel de vivero que puedan ser manejados por los viveristas y productores. En este caso, se eliminó la dominancia apical y mediante el doblamiento del tallo deshojado se logró estimular la inducción y crecimiento de una de las dos yemas axilares existente por nudo. Cada brote originado fue enraizado exitosamente en agua durante dos semanas.

Con este procedimiento se encontró que las plantas jóvenes provenientes de condiciones *in vitro* pueden ser utilizadas como fuente para la generación de brotes ortotrópicos como material de propagación. La eliminación de la dominancia apical y de las hojas, promueve la activación de las yemas axilares de los meristemas conduciendo a una mayor producción de brotes ortotrópicos. Estos resultados son similares a los obtenidos con plántulas de cacao derivadas de embriones somáticos y confirman las observaciones de Treore, Maximova y Guiltinan (2003) y Flynn, Glicenstein y Fritz (1990), en los que indican la inducción de brotes axilares y basales respectivamente, después de eliminar el ápice de las plantas jóvenes.

La combinación de la propagación *in vitro* y *ex vitro* permitirá una multiplicación más rápida de los mejores árboles para generar jardines clonales y para reemplazar o complementar plantaciones comerciales basadas en linajes de semilla sexual.

En general, con la metodología desarrollada es posible acelerar los procesos de micropropagación de árboles de guayaba de manera rápida y masiva, sin que se pierdan las características ideales que son importantes para el agricultor y la industria. Además, será de gran apoyo para la evaluación de clones en diferentes ambientes por parte de programas de mejoramiento genético que estén interesados en la propagación de genotipos con características novedosas. Por ejemplo, los genotipos de guayabas rojas que contienen muy pocas semillas, al ser sometidas a propagación rápida y masiva, se podrían incluir en plantaciones comerciales para aprovechar su valor agregado para la agroindustria; así mismo, la propagación de mutantes enanos o patrones enanificantes. Hasta donde conocen los autores, es la primera vez que

se logran resultados de micropropagación de la guayaba a nivel de laboratorio e invernadero en Colombia, de manera integrada y con miras a una aplicación práctica.

#### AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia (MADR) y la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). Las opiniones, resultados y conclusiones expresadas en esta publicación son responsabilidad de los autores.

#### BIBLIOGRAFIA CITADA

- Ali, N., R.M.S. Mulwa, M.A. Norton y R.M. Skirvin. 2003. Micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.). J. Hort. Sci. & Biotech. 78:739-741.
- Amin, M.N. y V.S. Jaiswal. 1988. Micropropagation as an aid to rapid cloning of guava cultivar. Scientia Horticulturae 36: 89-95.
- Birosiková, M., K. Spisáková, S. Liptak y V. Pichler. 2004. Micropropagation of mature wych elm (*Ulmus glabra* Hud). Plant Cell Rep. 22: 640-644.
- Flynn, W.P., L.J. Glicenstein y P.J. Fritz. 1990. *Theobroma cacao* L.: an axillary bud *in vitro* propagation procedure. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 20: 111-117.
- George, E., D. Puttock y H. George. 1982. Plant culture media. Editorial Exegetics Limited, Washington, 567 p.
- Jaiswal, V.S. y M.N. Amin. 1992. Guava and jackfruit. En: Hammerschlag, F.A. y R.E. Litz (eds.). Biotechnology of perennial fruit crops - Biotechnology in agriculture. C.A.B. Int., Wallingford, UK, pp. 8421-8431.
- Kaundal, G.S. e I.S. Deol. 1990. Budding techniques in clonal propagation of guava. Hort. J. 3: 1-2, 37-42.
- Lloyd, G. y B. McCown. 1980. Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society, pp. 421-427.
- Loh, C.S. y A.N. Rao. 1989. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava*) from seedlings and grafted plants and adventitious shoot formation *in vitro*. Scientia Horticulturae 39: 31-39.
- Majada, J.P. M.I. Sierra y R. Sánchez. 2000. One step for taxane production through enhanced *Taxus* propagation. Plant Cell Rep. 18: 825-830.
- Manoj, K.R., N. Akhtar y V.S. Jaiswal. 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Bañarais. Scientia Horticulturae 113(2): 129-133.
- Martin, F.W. 1984. Handbook of tropical food crops. CRC press Boca Ratón, FL, pp. 31-39.

- Mohamed-Yessen, M.Y., S.A. Barringer, R.J. Schnell y W.E. Splittstoesser. 1995. *In vitro* shoot proliferation of guava (*Psidium guajava* L.) from germinated seedlings. Plant Cell Rep. 14: 525-528.
- Papadatou, P. y C.A. Pontikis. 1990. Rapid multiplication of guava seedling by *in vitro* shoot tip culture. Scientia Horticulturae 45: 99-103.
- Peña, H.A., J.A. Díaz y T.R. Martínez. 1996. Fruticultura tropical. ICFES. segunda parte, p. 208.
- Pérez-Tornero, O., J. Egea, A. Vanoostende y L. Burgos. 2000. Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. Plant Science 158: 61-70.
- Pereira, E. M., E. Petrechen y M.M.P. Benincasa. 1991. Effect of IBA on rooting of guava softwood cuttings of cultivar Rica and Paluma under mist. Científica Jaboticabal 19(2):199-202.
- Prakash, D.P., P. Narayana-Swamy y S.N. Sundur. 2002. Analysis of molecular diversity in guava using RAPD markers. J. Hort. Sci. Biotech. 77: 287-93.
- Prasad, J., A. Rabbani y R.A. Ram. 1988. Rooting of hardwood cuttings of guava through bottom heat. Progressive Horticulture 20 (1-2):20-23.
- Ramírez-Villalobos, M.C. y E. Salazar-Yamarte. 1997. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava*). Rev. Fac. Agron. (Universidad de Zulia) 14: 497-506.
- Ramírez-Villalobos, M.C., S. León de Sierralta y A. Urdaneta. 1999. Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum*. Rev. Fac. Agron. (Universidad del Zulia) 16: 243-255.
- Singh, S.K., R.R. Meghwal, H.C. Sharma y S.P. Singh. 2002. Direct shoot organogenesis on hypocotyl explants from *in vitro* germinated seedlings of *Psidium guajava* L. cv. Allahabad Safeda. Scientia Horticulturae 95: 213-221.
- Toribio, M.; C. Fernández, C. Celestino, M.T. Martínez, M.C. Sanjosé y A.M. Vieitez. 2004. Somatic embryogenesis in mature *Quercus* rubber trees. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 76: 283-287.
- Treore, A.V., S.N. Maximova y M. Guiltinan. 2003. Micropropagation of *Theobroma cacao* using somatic embryo-derived plants. In Vitro Cell. Dev. Biol. 72: 1-7.
- Vilchez J.A., N.R. Albano, R.G. Kosky y D. Agramante. 2005. Embriogénesis somática y regeneración de plantas en *Psidium guajava* L. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. Sin publicar.
- Yadava, U.L. 1994. Physicochemical properties of guava produced in Georgia. HortScience 29: 536-537.