

Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Nierdz¹

Evaluation of surface disinfectants on the *in vitro* establishment of *Psidium guajava* L. and *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Nierdz

M. Ramírez Villalobos², S. León de Sierralta³ y A. Urdaneta Fernández⁴

Resumen

La contaminación por microorganismos, hongos y bacterias, es uno de los principales problemas que limitan el establecimiento aséptico de segmentos nodales de material adulto, tanto del guayabo (*Psidium guajava*) como del cas (*P. friedrichsthalianum*). Para disminuir la contaminación en cada especie se evaluaron tres agentes desinfectantes superficiales (DS): nitrato de plata (NP), cloruro mercúrico (CM) e hipoclorito de sodio (HS) a tres dosis y tres tiempos de exposición (5, 10 y 20 min). Las dosis fueron : 0; 0,5; 0,1 y 0,15% (p/v) para NP y CM; 0,5; 1 y 1,5% (v/v) de HS. Antes de realizar los tratamientos, los explantes se remojaron por 16 h en agua corriente, 15 min en 2 g L⁻¹ de benomil + 100 mg L⁻¹ de rifampicina y 1 min en alcohol etílico al 70% (v/v). El diseño estadístico fue totalmente al azar con 27 tratamientos y 4 repeticiones, con 5 explantes como unidad experimental y el testigo sin DS. Los resultados mostraron que en guayabo y cas el NP, CM y HS a las dosis y tiempos empleados no permitieron controlar la contaminación de los explantes y afectaron su viabilidad. La contaminación en el testigo fue menor que en el resto de los tratamientos. Estos resultados sugieren que el benomil y la rifampicina sean utilizados después de los DS, con los enjuagues previos de agua destilada esterilizada.

Palabras clave: microorganismos, viabilidad, cultivo *in vitro*, *Psidium guajava*, *Psidium friedrichsthalianum*.

Recibido el 16-01-1998 ● Aceptado el 23-11-1999

1. Trabajo financiado parcialmente por el CONDES-LUZ, bajo el proyecto N° 01736-98.
2. Posgrado de Fruticultura. Laboratorio de Cultivo de Tejidos. Instituto de Investigaciones Agronómicas. Facultad de Agronomía. La Universidad del Zulia (LUZ). Apartado 15205. Maracaibo, Zulia 4005. Venezuela. Fax: (061) 596183.
3. Departamento de Química. Facultad de Agronomía. La Universidad del Zulia (LUZ). Apartado 15205. Maracaibo, Zulia 4005. Venezuela. Fax: (061) 596183.
4. Ingeniero Agrónomo. Egresado de LUZ.

Abstract

Contamination by microorganisms, fungus or bacterias, is one of the problems that limits the aseptic establishment of guava (*Psidium guajava*) and cas (*P. friedrichsthalianum*) adult nodal segments. In order to reduce contamination on each species three surface disinfectants (SD): silver nitrate (SN), mercuric chloride (MC) and sodium hypochlorite (SH), and three doses and three exposition times (5, 10 and 20 min) were studied. The doses were 0,05; 0,1 and 0,15% (w/v) for SN and MC; 0,5; 1,0 and 1,5% (v/v) for SH. The explants were pretreated with running water during 16 h, after 15 min in benomyl at 2 g L^{-1} + rifampicine at 100 mg L^{-1} and 1 min in ethilic alcohol at 70% (v/v). A totally randomized statistical design with 27 treatments and 4 replications with 5 explants as the experimental unit and a control without SD was used. The results showed that in guava and cas the SN, MC y SH at the doses and times used did not control contamination of the explants and affected viability. The contamination in the control treatment was less than the rest of the treatments. This result suggests that benomyl and rifampicine should be used after de SD with previous rinses in distilled sterilized water.

Keys words: microorganisms, viability, *in vitro* culture, *Psidium guajava*, *Psidium friedrichsthalianum*.

Introducción

El guayabo (*Psidium guajava* L.) es originario de América Tropical y una de las especies más importantes de las Mirtáceas, familia que incluye otras especies frutícolas de importancia económica como el cas (*P. friedrichsthalianum* (Berg) Nierdz) (3). La especie *P. friedrichsthalianum* ha sido señalada como resistente a nematodos del género *Meloidogyne* y considerada como una alternativa conveniente para el control de los mismos (6, 7, 8).

Tanto el guayabo como el cas son reproducidos por medio de semilla sexual, lo cual ha generado variación genética en las características de las poblaciones, especialmente en el guayabo donde se ha reportado cierto porcentaje de polinización cruzada (31). En el cas, diferencias a nivel de las

flores han sido evidenciadas por Sánchez (28).

El cultivo *in vitro* por segmentos nodales es una técnica que permite propagar asexualmente estas especies, manteniendo las características agronómicas deseadas. Esto se debe a que las yemas axilares del explante se desarrollan en brotes, ocurriendo de esta manera una organogénesis directa. Investigaciones efectuadas por Amin y Jaiswal (1, 2), Jaiswal y Amin (14), Loh y Rao (17), Broochijk (5), Fitchet (9, 10) y Pírela y Mogollón (22) demuestran la posibilidad de obtener plantas de guayabo por vía *in vitro*.

La presencia de microorganismos contaminantes, hongos y bacterias, es uno de los principales problemas durante el establecimiento *in vitro* de explantes

procedentes de plantas leñosas, sobretudo de condición adulta y cultivadas directamente en el campo (12, 13, 32). Al respecto, investigaciones de Litz y Conover (16) indicaron la imposibilidad de controlar la contaminación microbiana en su totalidad, cuando trabajaron con plantas de *Carica papaya* procedentes de campo en condiciones tropicales. En este sentido, Rey *et al.* (26) encontraron que segmentos nodales de yerba mate cultivados *in vitro* mostraron un comportamiento similar al de la mayoría de las especies leñosas, donde la implantación de los cultivos puede verse dificultada por la contaminación con hongos, bacterias o ambos. Viloria (32) evaluó varios métodos de desinfección superficial utilizados en el cultivo *in vitro* de especies leñosas con

el fin de establecer asépticamente nudos de guayabo colectados de plantas adultas, y concluyó que la diversidad de la microbiota presente en el material seleccionado dificultó la esterilización exitosa de los explantes, y por ende, su establecimiento. Resultados similares fueron obtenidos por Somarribas *et al.* (30) en chayote, Borges *et al.* (4) y Quintero *et al.* (23) en mango.

En este trabajo se planteó como objetivo evaluar, tanto en guayabo como en cas, el efecto de los desinfectantes superficiales: nitrato de plata, cloruro mercúrico e hipoclorito de sodio, a tres niveles de dosis y tiempos de exposición, en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales procedentes de material adulto cultivado en el campo.

Materiales y métodos

Material vegetal. El material vegetal para este trabajo provino de plantas de guayabo (*Psidium guajava* L.) de cuatro años de edad cultivadas en el campo.

Recolección y preparación del material vegetal. Se recolectaron brotes terminales de 15 cm de longitud (figura 1a), los cuales permanecieron en cámara húmeda hasta su traslado al laboratorio, en donde se les eliminaron las hojas, dejando parte del pecíolo para evitar dañar las yemas. Posteriormente, se prepararon segmentos binodales o miniestacas (figura 1b), para efectuar el procedimiento de desinfección superficial. En guayabo, consistieron de dos pares de yemas axilares, correspondientes al tercer y cuarto

nudo (5, 32) y en cas, del cuarto y quinto nudo desde la parte apical del brote.

Procedimiento de desinfección superficial. Después de remojar los segmentos binodales por 16 h en agua corriente, se sumergieron por 15 min en 2 g L⁻¹ de benomil + 100 mg L⁻¹ de rifampicina y 1 min en alcohol etílico al 70%, para proceder a exponerlos en los tres desinfectantes superficiales: nitrato de plata (NP), cloruro mercúrico (CM) e hipoclorito de sodio (HS) a tres dosis y tres tiempos de exposición (5, 10 y 20 min). Las dosis de los desinfectantes superficiales fueron: 0,05; 0,1 y 0,15% (p/v) para NP y CM; 0,5; 1 y 1,5% (v/v) de HS. Inmediatamente, se realizaron tres enjuagues con agua destilada

esterilizada y el corte de los explantes (figura 1c).

Medio de cultivo y condiciones de incubación. La siembra se efectuó en tubos de ensayo (150 mm x 25 mm) con 10 mL de medio nutritivo de Murashige y Skoog (20) en estado líquido, complementado con 1 mg L⁻¹ de las siguientes vitaminas: tiamina, piridoxina y ácido nicotínico, 100 mg L⁻¹ de mioinositol y 20 g L⁻¹ de sacarosa. El pH del medio se ajustó a 5,8 antes de esterilizarlo a 121 °C y 1,1 kg cm⁻² por 20 min. Las condiciones de incubación de los explantes fueron bajo oscuridad a una temperatura de 25 ± 1°C.

Tratamientos, diseño estadístico y variables de estudio. En cada especie se evaluaron 27 tratamientos y un testigo, sin desinfectante superficial, bajo un diseño estadístico totalmente al azar con 4 repeticiones. La unidad experimental fue de 5 explantes, valor muy cercano al determinado por Parra y Ascanio (21) para la variable número

de hojas, en ápices de pimentón, la cual se encontraba entre 6 y 10 explantes.

Las variables de estudio fueron porcentajes de explantes con: hongos (PEH), bacterias (PEB), contaminados con hongos y bacterias (PEC) y viables (PEV). Los hongos se detectaron por medio de la presencia de micelio y las bacterias a través de los exudados presentes en el explante o en la base de éste, en contacto con el medio de cultivo. Se denominó explante viable aquel de color verde y no viable aquel de color verde amarillento, pardo o totalmente negro. La evaluación de las variables se efectuó a los 7 días de la siembra.

Análisis estadístico. Las variables fueron transformadas con la ecuación $(x + 1)^{1/2}$ por no seguir una distribución normal y así lograr el ajuste de la normalidad. El análisis se realizó a través del procedimiento ADEVA del paquete SAS (29) y cuando hubo efectos de significancia se aplicó la prueba de Tukey.

Resultados y discusión

En el cuadro 1 se aprecia que, tanto en guayabo como en cas, los desinfectantes superficiales presentaron diferencias significativas en todas las variables evaluadas. Al hacer una comparación entre NP, CM e HS, se nota que los dos primeros tuvieron el mismo comportamiento y difirieron significativamente del HS, el cual mostró los mayores valores de PEH, PEB, PEC y PEV.

Los PEC son análogos con investigaciones efectuadas en guayabo por Vilorio (32) y en otras especies,

donde se han indicado altos porcentajes, tales como: de 67 a 90% en helecho (11), 68% en café (12), 85% en chayote (30) y 75% en yerba mate (26). Así mismo, concuerdan con trabajos recientes (25) donde a los 8 días de la siembra de los explantes se registraron valores de 80 y 40% al utilizar por 15 min HS al 5,25% o hipoclorito de calcio al 10%, respectivamente; encontrándose además que ninguno de los tratamientos por sí solo pudo eliminar completamente los microorganismos

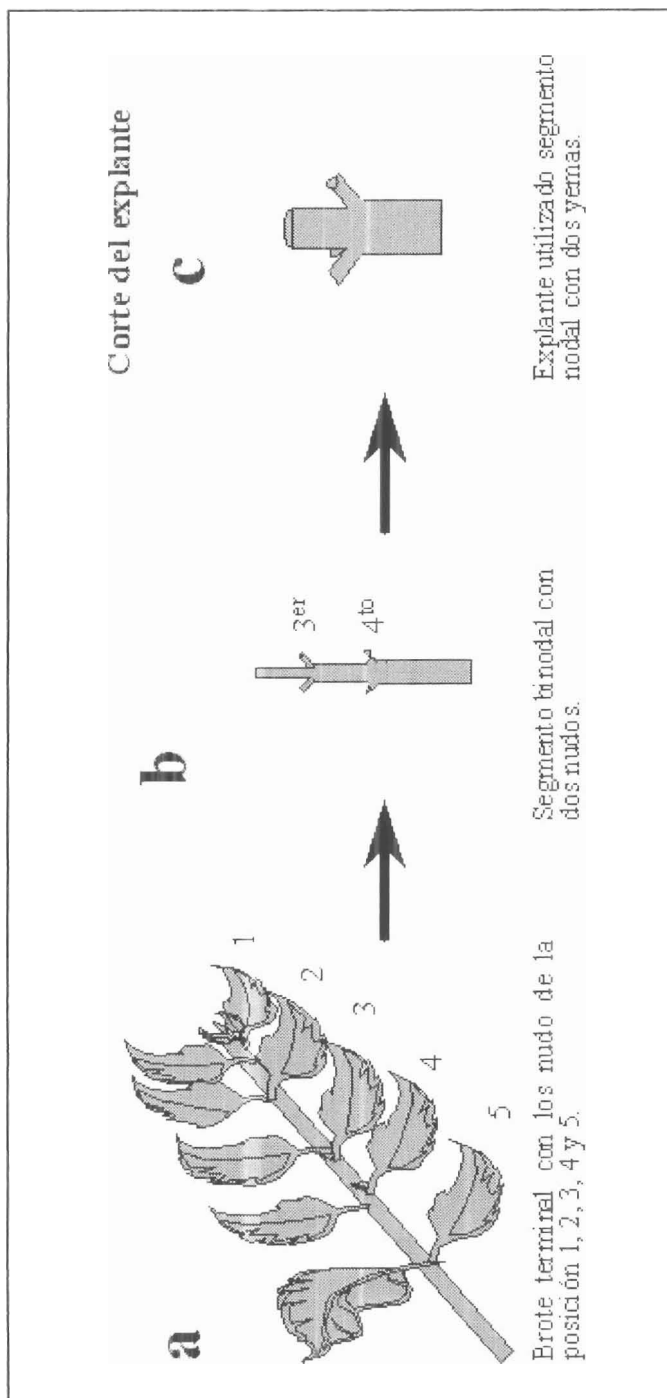


Figura 1. Procedimiento de preparación de los explantes o segmentos nodales del guayabo, para el establecimiento *in vitro*.

Cuadro 1. Efecto de desinfectantes superficiales sobre los porcentajes de explantes con hongos (PEH), bacterias (PEB), contaminados con ambos (PEC) y viables (PEV) durante el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* y *P. friedrichsthalianum*.

Desinfectante	<i>Psidium guajava</i>				<i>Psidium friedrichsthalianum</i>			
	PEH	PEB	PEC	PEV	PEH	PEB	PEC	PEV
Nitrato plata	35,0 ^b	38,6 ^b	59,8 ^b	38,0 ^c	48,1 ^b	42,6 ^b	62,2 ^b	13,3 ^c
Cloruro mercurico	32,7 ^b	29,3 ^b	51,6 ^b	32,7 ^c	46,9 ^b	40,6 ^b	65,5 ^b	11,2 ^c
Hipoclorito sodio	55,6 ^a	60,9 ^a	69,5 ^a	50,3 ^b	62,9 ^a	69,3 ^a	76,3 ^a	29,0 ^b
Testigo	15,0 ^c	20,0 ^b	30,0 ^c	75,0 ^a	30,0 ^c	40,0 ^b	45,0 ^c	55,0 ^a

a, b, c : Letras distintas indican diferencias estadísticas entre las medias.

contaminantes y mantener el explante en buenas condiciones. También se mencionó que la aplicación de benomil y sulfato de gentamicina en el medio de cultivo y/o antes de la siembra mostraron de 42 a 88% de contaminación, respectivamente.

Los resultados de PEV con cloruro mercúrico son semejantes a los obtenidos por Viloria (32), quien encontró que este desinfectante permitió obtener en plantas jóvenes de guayabo un 55,55% de explantes viables a los 10 días de la siembra, al utilizarlo por 5 min a una concentración de 0,1% y en plantas adultas con 0,12%.

El NP y CM presentaron bajos PEV, asociados a un posible efecto tóxico sobre el explante. Esto último ha sido mencionado en *Quercus suber*, cuando se utilizó el cloruro mercúrico a 0,2% (18) y en guayabo a 0,3% o en dosis mayores eliminando totalmente la microbiota contaminante y ocasionando la muerte de todos los explantes, lográndose obtener viables a dosis de 0,12 % (32). Con el uso del HS al 5,25% se ha señalado que la exposición de los segmentos nodales del guayabo por más de 8 min ha ocasionado el oscurecimiento total o la muerte de los explantes, evidenciando su efecto tóxico (25). El efecto de estos compuestos se corresponde con Mroginski y Roca (19), al señalar que son altamente tóxicos y no son fácilmente removibles del explante.

El testigo de ambas especies contrastó significativamente con el NP, CM e HS, alcanzando los menores valores de PEH, PEB, PEC y mayores de PEV; los bajos PEH y PEC se podrían asociar a una mejor acción del

fungicida benomil en el explante, ya que el testigo no incluía el uso de desinfectante superficial, después del tiempo de exposición en el benomil -- el antibiótico rifampicina y en alcohol etílico. Al respecto, se ha encontrado que el contacto prolongado de los explantes con el fungicida y antibiótico contribuye a disminuir la aparición de bacterias y hongos, sobretodo, cuando éstos se aplicaban en el medio de cultivo y/o antes de la siembra de los explantes (25). En los tratamientos donde se contemplaba el uso de los desinfectantes superficiales los PEH, PEB y PEC fueron mayores y el PEV menor. Estos resultados permiten inferir que posiblemente sería conveniente utilizar en un inicio los desinfectantes superficiales y luego efectuar los enjuagues respectivos, con agua destilada esterilizada, para posteriormente sumergir los explantes en el fungicida y antibiótico por separado, como también exponerlos por mayor tiempo en los mismos, debido a que investigaciones de Giladi *et al.* (13) han señalado que la asepsia de los explantes de *Citrus sinensis* se vio afectada por el orden de inmersión en alcohol etílico e hipoclorito de sodio; el mayor porcentaje de explantes asépticos lo lograron al sumergir los explantes primero en hipoclorito de sodio y luego en alcohol etílico.

El NP, CM y testigo no mostraron diferencias en el control de las bacterias, lo que indica que ambos desinfectantes y el antibiótico remanente en el explante del testigo tienen un efecto positivo sobre el control o disminución de la presencia de bacterias.

El cuadro 2 muestra que hubo

Cuadro 2. Efecto del tiempo de exposición en el desinfectante superficial sobre los porcentajes de explantes con hongos (PEH), bacterias (PEB), contaminados con ambos (PEC) y viables (PEV) durante el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* y *P. friedrichsthalianum*.

Tiempo (min)	<i>Psidium guajava</i>			<i>Psidium friedrichsthalianum</i>				
	PEH	PEB	PEC	PEV	PEH	PEB	PEC	PEV
5	48,6 ^a	52,7 ^a	74,9 ^a	52,2 ^a	53,3 ^a	50,9 ^a	82,7 ^a	28,3 ^a
10	31,1 ^b	45,6 ^{ab}	67,5 ^b	47,7 ^b	46,2 ^a	42,4 ^{ab}	61,6 ^b	19,2 ^b
20	20,3 ^b	31,3 ^b	56,2 ^b	45,4 ^b	30,1 ^b	34,0 ^b	51,2 ^b	10,0 ^b

Medias con letras distintas (a, b) difieren significativamente ($P < 0,05$).

diferencias significativas en los tiempos de exposición en el desinfectante superficial para todas las variables evaluadas en ambas especies. En guayabo, los PEH, PEC y PEV disminuyeron significativamente a los 10 min y el PEB a los 20 min; en cas, los PEC y PEV disminuyeron a los 10 min y el PEH y PEB a los 20 min. Estos resultados son diferentes a los registrados por Ramírez y Salazar (25), quienes señalaron que tiempos de exposición menores o iguales a 4 min no controlaron el desarrollo de los microorganismos contaminantes, y que el HS al 5,25 % por 30 min permitió el control, afectando la viabilidad. Estas diferencias pueden estar afectadas por el tipo de procedimiento de desinfección superficial utilizado y a las condiciones ambientales bajo las cuales se desarrollaron las plantas madres.

En el cuadro 3 se observa que la concentración utilizada de desinfectante superficial tuvo efectos significativos en las variables evaluadas, tanto en guayabo como en

cas. En ambos cultivos, el testigo mostró los menores PEH, PEB y PEC y los mayores PEV, valores que fueron significativamente diferentes en la concentración del desinfectante superficial, a excepción de la variable PEB donde el testigo solamente fue diferente de NP y CM. En guayabo, la dosis de 0,5 % de HS presentó un comportamiento análogo al testigo en el PEV, indicando que éste producto no afectó la viabilidad de los explantes, resultado que coincide con los obtenidos en mora (*Rubus glaucus*) por Ramírez y Angarita (24), quienes encontraron que concentraciones mayores de 0,5 % de HS afectaron la viabilidad.

En cuanto al CM, los PEC difieren del indicado por Khattak *et al.* (15), quienes registraron un 10 % al emplear 0,05 % de CM por 5 min; de igual manera los resultados no tienen semejanza con los de Broodrijk (5), quien describió un método de desinfección superficial para el establecimiento *in vitro* del guayabo consistente en colocar los explantes por 1 min en etanol, un enjuague de 5 s

Cuadro 3. Efecto de la concentración del desinfectante superficial (DS) sobre los porcentajes de explantes con hongos (PEH), bacterias (PEB), contaminados con ambos (PEC) y viables (PEV) durante el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* y *P. friedrichsthalianum*.

Concentración del DS (%)	<i>Psidium guajava</i>					<i>P. friedrichsthalianum</i>				
	PEH	PEB	PEC	PEV	PEV	PEH	PEB	PEC	PEV	PEV
0,05 NP	46,7 ^b	39,7 ^b	68,3 ^{ab}	40,7 ^b	58,8 ^b	48,9 ^b	71,0 ^b	20,5 ^b	11,6 ^{abc}	7,9 ^c
0,10 NP	25,0 ^d	38,3 ^b	58,7 ^{cd}	36,3 ^c	45,2 ^{cd}	40,1 ^b	60,2 ^c	18,7 ^{bc}	9,8 ^{bc}	5,1 ^e
0,15 NP	23,3 ^d	37,9 ^b	52,3 ^{dc}	37,1 ^{bc}	40,3 ^d	38,7 ^b	55,4 ^c	62,2 ^c	82,7 ^a	26,5 ^b
0,05 CM	42,9 ^{bc}	30,1 ^b	63,3 ^{bc}	45,8 ^b	52,6 ^b	41,4 ^b	73,8 ^b	17,6 ^{bcd}	12,9 ^{abc}	55,0 ^a
0,10 CM	33,7 ^c	27,9 ^b	51,6 ^c	33,2 ^c	49,9 ^c	40,7 ^b	60,4 ^c	45,0 ^b	45,0 ^d	
0,15 CM	21,5 ^d	29,8 ^b	40,0 ^f	19,0 ^d	38,3 ^d	39,7 ^b	62,2 ^c			
0,5 HS	66,3 ^a	60,5 ^a	75,0 ^a	67,1 ^a	74,7 ^a	71,5 ^a	82,7 ^a			
1,0 HS	59,7 ^a	62,5 ^a	72,3 ^a	40,2 ^b	62,7 ^b	69,1 ^a	75,7 ^b			
1,5 HS	40,8 ^{bc}	59,7 ^a	61,2 ^c	43,6 ^b	51,3 ^{bc}	67,3 ^a	70,5 ^b			
Testigo	15,0 ^e	20,0 ^b	30,0 ^e	75,0 ^a	30,0 ^e	40,0 ^b	45,0 ^d			

NP: Nitrato de Plata. CM: Cloruro Mercuríco. HS: Hipoclorito de Sodio. Medias con letras distintas (a, b, c, d, e, f, g) difieren significativamente (P<0,05).

con yoduro de potasio al 0,05% y 15 min en nitrato de plata al 0,5%.

Al comparar las concentraciones en cada desinfectante superficial se encontró que en ambas especies el NP a 0,10 y 0,15% permitió el menor PEC y a 0,05% el mayor PEV. Con el CM ocurrió lo mismo en el PEV, y en el PEC los menores valores se lograron en guayabo con 0,15 % y en cas con 0,10 y 0,15%. Sin embargo, se nota que el testigo fue el mejor tratamiento por presentar el mínimo PEC y máximo PEV, asociados a la acción del fungicida y el antibiótico.

Es importante indicar que a los 14 días, después de la siembra, muchos de los explantes viables y sin contaminación murieron, o bien, se contaminaron, lo cual repercutió en que ninguno de los tratamientos fue efectivo para controlar la contaminación sin afectar la viabilidad de los explantes. Por tal motivo, sería conveniente utilizar desinfectantes superficiales poco tóxicos, como el hipoclorito de sodio, en tiempos no mayores de 10 min para no afectar la viabilidad, así mismo, implementar el uso del fungicida y antibiótico posterior a los enjuagues con agua destilada esterilizada del desinfectante o antes de la siembra de los explantes, para que éstos queden impregnados de dichos productos y puedan actuar sobre los contaminantes, ya que es posible que en las irregularidades presentes en la superficie del explante queden bacterias, esporas de hongos, polvo u otros, donde los desinfectantes no lograron llegar (27). Otro aspecto es,

excluir el alcohol etílico porque éste podría desplazar o lavar gran parte del fungicida o antibiótico impregnado en el explante, perdiéndose la acción de éstos.

Los resultados obtenidos en guayabo y cas coinciden con los de Viloría (32), quien encontró que indicaron grandes problemas de contaminación durante el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales, procedentes de plantas adultas de guayabo cultivadas en el campo, al evaluar varios métodos de desinfección superficial utilizados en plantas leñosas, además de que la viabilidad estuvo relacionada en gran medida con el tipo de desinfectante aplicado y su concentración. Sin embargo, contrastan con los de Pírela y Mogollón (22), quienes obtuvieron 7 % de contaminación al emplear miniestacas de 2,5 cm de longitud provenientes de plantas injertadas de guayabo y utilizar el procedimiento de desinfección siguiente: 15 min en hipoclorito de sodio al 10%, 5 min en nitrato de plata al 0,1% y 5 min en cloruro mercúrico al 0,1%. Así mismo, con los obtenidos por Amin y Jaiswal (1) de 5 a 7%, al utilizar cloruro mercúrico al 0,05 % por 2 min. De igual modo difieren del trabajo de Khattak *et al.* (15), quienes señalaron 10 y 30% de contaminación en explantes procedentes de plántulas y brotes de ramas cubiertos con material plástico, respectivamente, y desinfectarlos con cloruro mercúrico al 0,05 % por 5 min.

Conclusiones

El tratamiento de sumergir los segmentos nodales durante 30 min en 2 g L⁻¹ de benomil más 100 mg L⁻¹ de rifampicina y luego 1 min en alcohol etílico al 70 % fue el mejor por permitir obtener el menor porcentaje de explantes contaminados y el mayor de explantes viables, a los 7 días de la siembra.

Las concentraciones y tiempos empleados de los desinfectantes superficiales: nitrato de plata, cloruro mercúrico e hipoclorito de sodio no

lograron controlar los microorganismos contaminantes presentes en los explantes de guayabo y cas, durante su establecimiento *in vitro*, sin afectar su viabilidad.

El tiempo de 10 min de exposición en el desinfectante superficial resultó ser el mejor, en ambas especies, para disminuir los porcentajes de explantes contaminados por hongos y bacterias y el de 5 min para incrementar el de explantes viables.

Recomendaciones

Evaluar el efecto del orden de utilización entre los desinfectantes superficiales, enjuagues con agua destilada esterilizada, fungicidas y antibióticos en la contaminación, oscurecimiento, viabilidad y brotación de los explantes durante su establecimiento *in vitro*.

Utilizar material vegetal

procedente de plantas madres cultivadas en el campo, a pesar de los serios problemas de contaminación durante la etapa de establecimiento, ya que se considera conveniente establecer una metodología de desinfección superficial que permita propagar masivamente el material elitesco.

Agradecimiento

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) por la beca otorgada para cursar estudios de Maestría en Fruticultura en La Universidad del Zulia. Al Ing. José Matheus del CENFRUZU-

CORPOZULIA por facilitar las plantas de guayabo y cas. Al Técnico Miguel Molina y las Ings. Arlenis Alborno, Gledys Atencio y Yajaira Urdaneta por su colaboración en las tareas de laboratorio.

Literatura citada

1. Amin, M. N. and V. S. Jaiswal. 1987. Rapid clonal propagation of through *in vitro* shoot proliferation on nodal explants of mature trees. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 9: 235-243.
2. Amin, M. N. and V. S. Jaiswal. 1988. Micropropagation as an aid to rapid cloning of guava cultivar. *Scientia Hort.* 36: 89-95.
3. Avilán, L.; F. Leal y D. Bautista. 1992. Manual de Fruticultura. Principios y manejo de la producción. Segunda Edición. Tomo II. Editorial América C. A. Caracas, Venezuela. p. 777-1472.
4. Borges, L.; H. Morales, Z. Valero, S. León de S., R. Santos, C. Castro de R. y A. Del Villar. 1997. Comparación de métodos de esterilización superficial de yemas apicales de mango (*Mangifera indica* L.) variedad Haden. En resúmenes: VII Jornadas Científico Técnicas. Maracaibo, Venezuela. p.102.
5. Broodrijk, M. 1989. New sterilization method for the *in vitro* culture of guavas (*Psidium guajava*). *Information Bulletin Citrus and Subtropical Fruit. Research Institute* N° 202: 1-2.
6. Casassa P., A. M.; J. M. Matheus C., R. Crozzoli P. y D. Rivas. 1993. Comportamiento de *Psidium friedrichsthalianum* y *Psidium guajava* creciendo en un campo infestado con el nematodo *Meloidogyne* spp. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 10 Suplemento 1: 74 (Resumen).
7. Casassa P., A. M.; J. M. Matheus C., R. Crozzoli P. y A. Casanova. 1996. Control químico de *Meloidogyne* spp. En el cultivo del guayabo (*Psidium guajava* L.) en el municipio Mara del estado Zulia, Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 13: 303-312.
8. Cuadra, R. y A. Quincosa. 1982. Comportamiento de diferentes especies de *Psidium* como patrones para guayabo resistentes a *Meloidogyne*. *Ciencias de la Agricultura* 13: 19-26.
9. Fitchet, M. 1989. Tissue culture of guava. *Information Bulletin, Citrus and Subtropical Fruit Research Institute, South Africa* 201: 4-5.
10. Fitchet P., M. 1990. Dimple guava established in tissue culture. *Information Bulletin Navorsingsinstituut vir Sitrus en Subtropiese Vrugte* 212: 5
11. Furelli, L. y E. C. de García. 1987. Regeneración de plantas a partir de explantes foliares del helecho *Pteris cretica* "Winsettii". *Agron. Trop.* 3: 19-30.
12. G. de García, E. y M. Rafael. 1990. Control de la oxidación y contaminación en microesquejes de café (*Coffea arabica* 'Catimor') cultivados 'in vitro'. *Agron. Trop.* 40: 281-290.
13. Giladi, I.; A. Altman and R. Gorer. 1979. A method for aseptic culture of bud explants from citrus trees. *Scientia Hort.* 10: 357-362.
14. Jaiswal, V. S. and M. N. Amin. 1987. *In vitro* propagation of guava from shoot cultures of mature trees. *J. Plant Phys.* 130: 7-12.
15. Khattak, M. S., M. N. Malik and M. A. Khan. 1990. Effect of surface sterilization agents on *in vitro* culture of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Sufeda tissue. *Sarhad J. of Agric.* 6: 151-154.
16. Litz, R. E. and R. A. Conover. 1981. Effect of sex type, season, and other factors on *in vitro* establishment and culture of *Carica papaya* L. explants. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106: 792-794.
17. Loh, C. S. and A. N. Rao. 1989. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from seedlings and grafted plants and adventitious shoot formation *in vitro*. *Scientia Hort.* 39: 31-39.
18. Manzanera, J. A. and J. A. Pardos. 1990. Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 21: 1-8.

19. Mroginski, L. A. y W. M. Roca. 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. In: p. 19-40. W. M. Roca y L. A. Mroginski (Eds). Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT. Cali, Colombia. Publicación N° 151.
20. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Phys. Plant.* 15: 473-493.
21. Parra, J. y M. Ascanio E. 1997. Determinación del tamaño de la unidad experimental y el muestreo dentro de la misma en ápices de pimentón (*Capsicum annum* L.) y callos de canavalia (*Canavalia ensiformis* L.) cultivados *in vitro*. En resúmenes: XIII Jornadas Agronómicas. Maracay, Venezuela. p. 25.
22. Pirela, M. and N. Mogollón. 1996. *In vitro* clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Mara-7 from stem shoots of cv. Mara-7. *Acta Horticulturae* 452: 47-52. Proceedings of the Internacional Symposium on Myrtaceae. L. C. Donadio (Ed.) ISHS.
23. Quintero, W.; G. Mas y Rubí, R. Santos, S. León de S., C. Castro de R. y B. Bracho. 1997. Efectos de la temperatura y tiempos de inmersión en el control de la contaminación de yemas apicales de mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden, cultivadas *in vitro*. En resúmenes: VII Jornadas Científico Técnicas. Maracaibo, Venezuela. p.101.
24. Ramírez, A. y A. Angarita. 1990. Estudios preliminares para la propagación clonal *in vitro* de mora (*Rubus glaucus* L.). *Agronomía Colombiana*. 7: 17-25.
25. Ramírez, M. y E. Salazar. 1997. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.) *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 14: 497-506.
26. Rey, H. Y.; O. J. Burtnik, P. A. Sansberro y L. A. Mroginski. 1991. Medios de cultivo para el establecimiento *in vitro* de explantos de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *Turrialba* 41: 306-310.
27. Roca, W. M. y L. Mroginski. 1991. Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. In: p. 1-17. W. M. Roca y L. A. Mroginski (Eds). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. Publicación N° 151.
28. Sánchez U., A. B. 1997. Modelo de descriptor botánico para dos especies de *Psidium* (*P. guajava* y *P. Friedrichsthalianum*). Trabajo de Ascenso. La Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. Maracaibo, Venezuela. 151 pp.
29. SAS, Institute, INC. 1987. SAS (Statistical Analysis System) the Institute INC, Cary, NC, USA.
30. Somarribas, G.; J. Sandoval y L. Müller. 1991. Propagación vegetativa del chayote (*Sechium edule* (Jacq) Sv). Fase de establecimiento. *Turrialba* 41: 538-544.
31. Soubihe, J. e J. Gurdel. 1962. Taxa de panmixia na goiabeira. *Bragantia* (Brazil) 21: 15-20.
32. Viloria V., Z. J. 1993. Cultivo *in vitro* de nudos de guayabo (*Psidium guajava* L.). Fase I. Trabajo de Ascenso. La Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. Maracaibo, Venezuela. 35 pp.