



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

---

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS  
AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**FRUTICULTURA**

**DETECCIÓN TEMPRANA DE COMPATIBILIDAD DE INJERTOS PARA  
DIFERENTES SELECCIONES DE GUAYABO (*Psidium guajava* L.) A  
TRAVÉS DE ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y ANATÓMICO**

**BLANCA BERENICE FLORES ESPINOSA**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

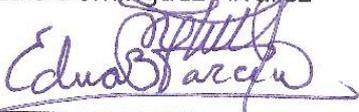
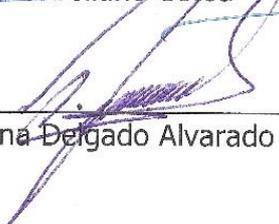
**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

**2016**

La presente tesis, titulada: **DETECCIÓN TEMPRANA DE COMPATIBILIDAD DE INJERTOS PARA DIFERENTES SELECCIONES DE GUAYABO (*Psidium guajava* L.) A TRAVÉS DE ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y ANATÓMICO** realizada por la alumna: **Blanca Berenice Flores Espinosa**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS**  
**RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**  
**FRUTICULTURA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO	 _____ Dra. Ma. Alejandra Gutiérrez Espinosa
ASESOR	 _____ Dr. José Luis Domínguez Álvarez
ASESOR	 _____ Dr. Eduardo García Villanueva
ASESOR	 _____ Dr. Gregorio Arellano Ostoa
ASESOR	 _____ Dra. Adriana Delgado Alvarado

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Mayo de 2016

# DETECCIÓN TEMPRANA DE COMPATIBILIDAD DE INJERTOS PARA DIFERENTES SELECCIONES DE GUAYABO (*Psidium guajava* L.) A TRAVÉS DE ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y ANATÓMICO

Blanca Berenice Flores Espinosa, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2016

## RESUMEN GENERAL

En México hay una gran variabilidad de especies del género *Psidium* como Cass (*P. friedrichsthalianum*) y guayaba Nayarit (*P. guajava*), los cuales poseen características que ayudaría a resolver algunos problemas existentes en el cultivo: el ataque de nemátodos y problemas de fertilidad en los suelos. Tomando en cuenta que la propagación de portainjertos es importante, la presente investigación se planteó optimizar el enraizamiento *in vitro* de los portainjertos Cass y guayaba Nayarit, mediante una inducción (24 horas) evaluado diferentes concentraciones de AIB 0.0 (T0), 3.42 (T1), 6.84 (T2), 10.27 (T3)  $\mu\text{mol}$ . La respuesta se determinó mediante la velocidad de enraizamiento, número y longitud de raíces. Para ambos portainjertos el mejor tratamiento fue el T2, las primeras raíces emergieron 9 días después de iniciado los tratamientos para Cass y 8 días después para Nayarit, alcanzando 72% y un 100% de enraizamiento respectivamente. Por otra parte se realizaron análisis para detectar la compatibilidad de diferentes selecciones de guayabo injertados sobre Cass y Nayarit mediante estudio anatómico, análisis de azúcares solubles y fenoles totales. Evaluando dos tipos de injertos: aproximación y púa invertida. Después de seis meses se tomaron muestras de diferentes secciones del tallo por arriba y debajo y en el punto de unión de los injertos. El análisis anatómico se realizó para la combinación 'Enana roja cubana'/Cass y Nayarit, no se encontraron diferencias entre los tipos para ninguna de las variables evaluadas, igualmente entre cada una de las secciones, por lo que se concluye que anatómicamente son compatibles. La mayor concentración de azúcares solubles totales fue en la combinación RER/Nayarit y la concentración más baja en la combinación RER/Cass, la sacarosa fue el azúcar que se encontró en mayor concentración. El análisis del contenido de fenoles totales reveló que la mayor fue en 'Enana roja cubana'/Nayarit, mientras que en las combinaciones injertadas sobre Cass, las concentraciones fueron menores. Respecto al tipo de injerto se encontraron diferencias, en el injerto de púa se obtuvieron mayor concentración de azúcares solubles, mientras que la mayor concentración de fenoles se obtuvo en el injerto de púa invertida. Estos análisis indican que existe compatibilidad y se puede promover el uso de portainjertos en guayabo.

**Palabras clave:** portainjertos, enraizamiento *in vitro*, compatibilidad, azúcares solubles, compuestos fenólicos totales.

# EARLY DETECTION OF COMPATIBILITY OF GRAFTS FOR DIFFERENT SELECTIONS OF GUAVA (*Psidium guajava* L.) THROUGH BIOCHEMICAL AND ANATOMY ANALYSIS

Blanca Berenice Flores Espinosa, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2016

## GENERAL ABSTRACT

In Mexico there are great variability of species of *Psidium* as Cass (*P. friedrichsthalianum*) and Nayarit Guava (*P. guajava*), which have features that help to solve some problems in the crop: nematodes attack and fertility problems in soils. Given that the propagation of rootstocks is important, this research was to optimize the *in vitro* rooting of Cass rootstocks and guava Nayarit, through induction (24 hours) evaluated different concentrations of IBA 0.0 (T0), 3.42 (T1), 6.84 (T2), 10.27 (T3)  $\mu\text{mol}$ . The response was determined by speed of rooting, number and length of roots. For both rootstocks the best treatment was T2, the first roots emerged 9 days after starting treatments for Cass and 8 days for Nayarit, reaching 72% and 100% of rooting respectively. Moreover analyzes were performed to detect the compatibility of different selections of guava tree grafted on Cass and Nayarit by anatomical study, analysis of soluble sugars and total phenols. Evaluating two types of grafts: approach and inverted thorn. After six months samples from different sections of the stem above and below and at the junction of the grafts they were taken. The anatomical analysis was performed for 'Enana roja cubana' / Cass and Nayarit combination, no difference between the rates for any of the variables evaluated equally between each of the sections, so it follows that are anatomically compatible found. The highest concentration of total soluble sugars was in the RER/Nayarit combination and the lowest concentration in the RER/Cass combination, sucrose was the sugar found in greater concentration. Analysis of total phenol content was revealed that most in 'Enana roja cubana' /Nayarit, while combinations grafted onto Cass, concentrations were lower. Regarding the type of graft differences were found in the inverted thorn higher concentration of soluble sugars were obtained, while the bulk concentration of phenols was obtained in the inverted thorn.. These analyzes indicate that there is compatibility and can promote the use of rootstocks in guayabo.

**Key words:** rootstock, rooting in vitro, compatibility, soluble sugars, total phenolic compounds.

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por permitirme lograr un objetivo más en la vida.

A el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por financiar mis estudios de doctorado.

A el **Colegio de Postgraduados** a quien agradezco por todos estos años de formación académica y profesional.

A la **Universidad Autónoma Chapingo** por todo el apoyo para la realización de esta investigación.

A los integrantes de mi **Consejo Particular**: a la Dra. Alejandra Gutierrez Espinosa, al Dr. José Luis Domínguez Álvarez, al Dr. Eduardo García Villanueva, al Dr. Gregorio Arellano Ostoia y a la Dra. Adriana Delgado Alvarado, por sus valiosas aportaciones académicas para la culminación de este trabajo.

Especialmente me gustaría agradecer a la Dra. Adriana, al Dr. Eduardo y al Dr. Gregorio, por todo su apoyo, colaboración, aprendizaje y consejos para la realización de este trabajo, por creer en mí, por siempre darme ánimos. Gracias.

Al Dr. José Luis Domínguez por su tiempo, apoyo, comprensión y aportaciones académicas para la realización de este trabajo.

A todos los académicos y docentes del Colegio de Postgraduados que contribuyeron en mi formación.

**Sinceramente**

**BLANCA BERENICE**

## **DEDICATORIA**

*A Toño, que siempre esta a mi lado, por su paciencia, apoyo, dedicación y por todo el amor. Por la dicha y alegría que próximamente llegara a nuestras vidas.*

*A mi bebé que ya amó con toda el alma.*

*A mis papás, Luis y Mercedes, por todo el apoyo incondicional que siempre me dan, por su comprensión y paciencia, este logro también es suyo. Los quiero!*

*A mis hermanos, Ivonne y César a quienes quiero mucho y quienes siempre pueden contar conmigo, por todos los momentos y risas compartidas.*

*A mis sobrinitos, Diego, Paola, Santi y Marijo por formar parte de mi vida, los quiero.*

*A toda mi familia (abuelos, tios y primos) que siempre se preocupan y estan al pendiente de mi, por su apoyo. A los que se adelantaron y me cuidan desde el cielo. Gracias*

*A todos los amigos y compañeros del COLPOS, en especial a Gaby, Siul, Alejandra, Jonas, Luis Angel, por todos los buenos momentos compartidos y apoyo.*

*A mis amigos Itzel, Martin, Vany con mucho cariño.*

***Sinceramente***

**BLANCA BERENICE**

## Contenido

RESUMEN GENERAL .....	iii
GENERAL ABSTRACT .....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
DEDICATORIA .....	vi
ÍNDICE DE CUADROS .....	x
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
1.1 INTRODUCCIÓN .....	1
1.2 Objetivos Generales .....	6
1.3 Objetivos particulares .....	6
1.4 Hipótesis.....	7
1.5 LITERATURA CITADA.....	8
<b>CAPÍTULO II</b> .....	11
2.1 REVISIÓN DE LITERATURA .....	11
2.1.1 Origen del género <i>Psidium</i> .....	11
2.1.2 Clasificación Taxonómica .....	11
2.1.3 Importancia del cultivo de guayabo.....	12
2.1.4 Descripción morfológica.....	13
2.1.5 Métodos de propagación del guayabo.....	15
2.1.6 Propagación in vitro de guayabo.....	17
2.1.7 Propagación por injerto .....	17
2.1.8 Compatibilidad de injertos .....	20
2.1.9 Incompatibilidad en injertos .....	21
2.1.10 Factores que influyen en la compatibilidad o incompatibilidad .....	23
2.1.11 LITERATURA CITADA.....	29
<b>CAPÍTULO III. DETECCIÓN TEMPRANA DE COMPATIBILIDAD I: <i>Psidium guajava</i> INJERTADA SOBRE <i>P. friedrichsthalianum</i> PROPAGADAS in vitro</b> .....	36
3.1 RESUMEN.....	36
3.2 ABSTRACT .....	37
3.3 INTRODUCCIÓN .....	38
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
3.4.1 Material Vegetal.....	39
3.4.2 Enraizamiento in vitro .....	40
3.4.3 Estudio anatómico.....	40

3.4.4 Injertación .....	41
3.4.5 Análisis anatómico .....	41
3.4.6 Cuantificación de azúcares solubles totales.....	42
3.4.7 Glucosa, fructosa y sacarosa .....	42
3.4.8 Determinación de Compuestos fenólicos totales .....	43
3.4.9 Análisis estadístico .....	43
3.5 RESULTADOS .....	44
3.5.1 Enraizamiento <i>in vitro</i> .....	44
3.5.2 Estudio anatómico de compatibilidad de injertos.....	45
3.5.3 Azúcares solubles totales (AST) y compuestos fenólicos totales (CFT).....	46
3.6 DISCUSIÓN.....	47
3.6.1 Cinética de enraizamiento <i>in vitro</i> .....	47
3.6.2 Estudio de compatibilidad de injertos: anatómico, azúcares solubles totales (AST) y compuestos fenólicos totales (CFT) .....	49
3.7 LITERATURA CITADA.....	54
<b>CAPITULO IV. DETECCIÓN TEMPRANA DE COMPATIBILIDAD II: GUAYABA ´Enana Roja Cubana´ INJERTADA SOBRE GUAYABA NAYARIT PROPAGADAS <i>in vitro</i></b> .....	67
4.1 RESUMEN .....	67
4.2 INTRODUCCIÓN .....	68
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
4.3.1 Material Vegetal.....	69
4.3.2 Enraizamiento <i>in vitro</i> .....	69
4.3.3 Estudio anatómico.....	70
4.3.4 Injertación .....	70
4.3.5 Análisis anatómico .....	71
4.3.6 Cuantificación de azúcares solubles totales.....	71
4.3.7 Glucosa, fructosa y sacarosa .....	72
4.3.8 Determinación de Compuestos fenólicos totales .....	72
4.3.9 Análisis estadísticos.....	72
4.4 RESULTADOS .....	73
4.4.1 Enraizamiento <i>in vitro</i> .....	73
4.4.2 Estudio anatómico de compatibilidad de injertos .....	76
4.5 DISCUSIÓN.....	83
4.5.1 Cinética de enraizamiento <i>in vitro</i> .....	83
4.5.2 Estudio de compatibilidad de injertos: anatomía, azúcares solubles totales (AST) y compuestos fenólicos totales (CFT) .....	85
4.6 LITERATURA CITADA.....	89

<b>CAPITULO V. EFECTO DE LOS PORTAINJERTOS CASS Y NAYARIT INJERTADOS SOBRE DIFERENTES SELECCIONES DE GUAYABO.....</b>	<b>94</b>
5.1 INTRODUCCIÓN.....	94
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	95
5.2.1 Material Vegetal.....	95
5.2.2 Injertación .....	96
5.2.3 Cuantificación de azúcares solubles totales.....	97
5.2.4 Glucosa, fructosa y sacarosa .....	98
5.2.5 Determinación de Compuestos fenólicos totales .....	99
5.2.6 Descripción de los tratamientos .....	99
5.2.7 Análisis estadístico .....	100
5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	101
5.4 LITERATURA CITADA.....	109
<b>CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>112</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 3.1</b> Comparación de medias de las diferentes concentraciones de AIB, para las variables número y longitud de raíces y porcentaje de enraizamiento en el portainjerto Cass ( <i>P. friedrichsthalianum</i> ). .....	63
<b>Cuadro 3.2</b> Comparación de medias de las características anatómicas de la madera y del floema secundario en el estudio de compatibilidad de guayabo: 'Enana roja cubana' injertada sobre Cass. ....	63
<b>Cuadro 3.3</b> Comparaciones de medias para las variables anatómicas observadas en cortes transversales en madera de guayabo en las diferentes secciones para 'Enana roja cubana' injertada sobre Cass, y de los testigos. ....	64
<b>Cuadro 3.4</b> Comparaciones de medias de las variables concentración de azúcares y compuestos fenólicos totales en los dos tipos de injerto de 'Enana roja cubana' injertada sobre Cass. ....	65
<b>Cuadro 3.5</b> Comparaciones de medias de las variables concentración de azúcares solubles totales, glucosa, fructosa, sacarosa y compuesto fenólicos totales (CFT) en 'Enana roja cubana' injertada sobre Cass, y los testigos, medidos arriba, debajo y en el punto de unión. ....	66
<b>Cuadro 4.1</b> Comparación de medias de las diferentes concentraciones de AIB, para las variables número y longitud de raíces y porcentaje de enraizamiento. ....	74
<b>Cuadro 4.2</b> Comparación de medias de las características anatómicas de la madera y del floema secundario en el estudio de compatibilidad de guayabo: 'Enana roja cubana' injertada sobre Nayarit. ....	76
<b>Cuadro 4.3</b> Comparaciones de medias para las variables anatómicas observadas en cortes transversales en madera de guayabo: 'Enana roja cubana' injertada sobre Nayarit, y de los testigos. ....	77
<b>Cuadro 4.4</b> Comparaciones de medias de la concentración de azúcares y compuestos fenólicos totales en los dos tipos de injerto de 'Enana roja cubana' injertada sobre Nayarit. ....	80
<b>Cuadro 4.5</b> Comparación de medias para la concentración de azúcares solubles totales, glucosa, fructosa, sacarosa y compuesto fenólicos totales (CFT) en 'Enana roja cubana' injertada sobre Nayarit, y los testigos en las posiciones arriba, debajo y en el punto de unión. .	82
<b>Cuadro 5.1</b> Características de los genotipos utilizados como portainjertos y varetas. ....	96
<b>Cuadro 5.2</b> Descripción de los tratamientos evaluados en el análisis bioquímico y fitoquímico .....	100
<b>Cuadro 5.3</b> Comparación de medias de la concentración de azúcares y compuestos fenólicos totales en las diferentes combinaciones de injertos. ....	103
<b>Cuadro 5.4</b> Comparaciones de medias de la concentración de azúcares y compuestos fenólicos totales en los dos tipos de injertos, donde se incluyen todas las combinaciones de injertos y sus testigos. ....	105
<b>Cuadro 5.5</b> Comparaciones de medias de la concentración de azúcares y compuestos fenólicos totales en cada una de las secciones evaluadas, donde se incluyen todas las combinaciones de injertos y sus testigos. ....	107

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 3.1</b> Esquema de las zonas de toma de muestra en los injertos. La imagen representa el injerto de aproximación ‘Enana roja cubana’ injertada sobre Cass. ....	59
<b>Figura 3.2</b> Efecto de la concentración de AIB sobre en el enraizamiento in vitro del portainjerto Cass, 30 días después del inicio de los tratamientos. ....	59
<b>Figura 3.3</b> Secciones longitudinales de la base de tallo del portainjerto Cass, tomadas de 0-9 días para el tratamiento 6.84 $\mu$ mol de AIB (T2) durante la inducción del enraizamiento. ....	60
<b>Figura 3.4</b> Cortes transversales mostrando la madera (xilema secundario) del Injerto Púa invertida (A) debajo del punto de unión, (B) punto de unión, (C) arriba del punto de unión. Injerto Aproximación (D) debajo del punto de unión, (E) punto d unión, (F) arriba del punto de unión.....	61
<b>Figura 3.5</b> Cortes transversales de la madera y corteza de tipos de injerto. Grosor de floema secundario (Fs). Injerto Púa invertida (A) debajo del punto de unión, (B) Arriba del punto de unión. Injerto Aproximación (C) debajo del punto de unión, (D) Arriba del punto de unión.....	62
<b>Figura 4.1</b> Efecto de la concentración de AIB sobre el enraizamiento in vitro del portainjerto Nayarit, 22 días después del inicio de los tratamientos.....	73
<b>Figura 4.2</b> Secciones longitudinales de la base de tallo del portainjerto Nayarit, tomadas de 0-8 días para el tratamiento 6.84 $\mu$ mol de AIB (T2) durante la inducción del enraizamiento .....	75
<b>Figura 4.3</b> Cortes transversales mostrando la madera (xilema secundario) del Injerto Púa invertida (A) debajo del punto de unión, (B) punto de unión, (C) arriba del punto de unión. Injerto Aproximación (D) debajo del punto de unión, (E) punto d unión, (F) arriba del punto de unión.....	78
<b>Figura 4.4</b> Cortes transversales de la madera y corteza de tipos de injerto. Grosor de floema secundario (Fs). Injerto Púa invertida (A) debajo del punto de unión, (B) Arriba del punto de unión. Injerto Aproximación (C) debajo del punto de unión, (D) Arriba del punto de unión.....	79
<b>Figura 5.1</b> Esquema de las zonas de toma de muestra en los injertos. A= Injerto de púa invertida, B= Injerto de aproximación de ‘Enana roja cubana’ sobre Cass.....	97

# CAPÍTULO I

## 1.1 INTRODUCCIÓN

El guayabo (*Psidium guajava* L.) es uno de los cultivos tropicales más importantes, por el alto valor nutricional e industrial de sus frutos (Medina y Pagano, 2003), el uso medicinal de sus compuestos (Jaiarj et al. 1999; Lozoya et al. 2002) y la creciente demanda en mercados nacionales e internacionales (Pages, 2004). México es uno de los principales productores a nivel internacional y los estados de Michoacán, Aguascalientes, y Zacatecas, cubren aproximadamente 93% de la producción nacional.

El guayabo pertenece a la familia Myrtaceae, el género *Psidium* es el más conocido y comprende más de 140 especies (Hayes, 1960). En México existe una gran variabilidad de especies, las principales son *P. guajava* la más grande, le siguen *P. sartorianum*, *P. guineense* Swartz, *P. friedrichsthalianum* (Berg.) Nied, *P. salutare*, *P. galapageium*, *P. cattleianum* y *P. cattleianum* *Lucidum*, las cuales poseen una excelente adaptación tanto al clima, como al suelo y pueden comportarse como árbol caducifolio o perennifolio, según la disponibilidad de humedad. Esta respuesta del guayabo a las diferentes condiciones ambientales puede estar asociada también a la enorme variabilidad genética que existe en México (Hayes, 1960; Popenoe, 1974). Sin embargo, a pesar de la gran variabilidad coexisten numerosos problemas que afectan al cultivo. Sobresale una alta incidencia de plagas y enfermedades (Peña et al. 1996), otro de los problemas importantes es la propagación de plantas (Pérez et al. 2002).

No se tiene reportado el uso de portainjertos en huertas comerciales de guayabo en México no obstante, las ventajas podrían ser muchas. Un patrón ideal para injertar sería aquel que se adapte tanto al clima como al suelo, ser tolerante a patógenos e inducir alta

producción y calidad de fruta, y un porte que facilite el manejo del cultivo (Monteverde 1989).

La elección del mejor portainjerto representa uno de los problemas más complejos de la fruticultura. Existen diferentes factores involucrados en la compatibilidad o incompatibilidad de los injertos que aún no se terminan de entender completamente, la mayoría de las investigaciones se centran en los mecanismos de desarrollo del injerto. Los cuales son citológicos y bioquímicos que ocurren en fases tempranas de los injertos, y las consecuencias de estos eventos en la respuesta futura del injerto. Existen varias hipótesis sobre los mecanismos de incompatibilidad, la mayoría descritas para plantas herbáceas, sin embargo, en plantas leñosas muchos casos de incompatibilidad se manifiestan por la ruptura del punto de unión varios años después.

La formación de callo es la primera respuesta del injerto que se produce tanto en injertos compatibles como incompatibles, dado que es una respuesta a la herida. El callo es la producción y entrelazamiento de células de parénquima por el patrón y la vareta. Este mecanismo es utilizado por la planta debido a que las células vivas de los dos componentes del injerto han quedado semi aislados por una capa de células muertas y suberizadas (Fahn, 1978).

Una vez que el callo se ha formado, los siguientes eventos son importantes en el desarrollo de las conexiones vasculares. Existen eventos estructurales correlacionados con los cambios en la pared celular que ocurren durante la formación del injerto en el que se describe un mecanismo de reconocimiento celular entre las células de injerto. La base de este sistema de reconocimiento es que las moléculas de proteína liberadas a partir del plasmalema se combinan para formar un complejo con actividad catalítica, que posteriormente inicia una secuencia de desarrollo que resulta en la formación de un injerto exitoso (descrito para solanáceas) (Yeoman, 1984). Cuando no se forma el complejo,

debido a las diferencias entre las células en contacto, una proteína llamada lectina produce un rechazo mutuo de las células, lo que resulta en injertos incompatibles.

Otros trabajos que han estudiado la formación de callo en el tejido, mencionan que la adhesión entre las células de la varetta y el portainjerto es mediante un “cemento” o material de unión, formado por una mezcla de pectina, hidratos de carbono, proteínas, grasas y una fibrilla (Miller y Barnett, 1993). Aunque también se sabe que en la unión de los injertos existen abundantes polímeros de la pared celular dispuestos en la reacción de reconocimiento celular. Los cuales son fragmentos de pectinas que se consideran como mensajeros químicos en la determinación de la compatibilidad de los injertos (Jefree y Yeoman, 1983).

Otro mecanismo de compatibilidad es la formación de plasmodesmos, los cuales son estructuras diversas y altamente dinámicas que ofrecen una vía única para la comunicación celular simplástica y constituyen una vía potencial entre las células del portainjerto y la varetta, permitiendo una interacción metabólica mutua, la cual requiere de lixiviación o difusión de algunos compuestos de ambos lados de la unión (injerto/portainjerto), con el fin de lograr una cohesión firme. El mecanismo de formación de plasmodesmos muestra diferencias en el desarrollo interespecífico implicado en la formación de la unión del injerto. Existe una formación de plasmodesmos secundarios que comienzan con la unión del retículo endoplasmático liso en el plasmalema (Ehlers y Kollmann, 2001). Después, un proceso de invaginación de la membrana plasmática se produce alrededor del retículo endoplasmático, que ocurre como consecuencia de la secreción del material de la pared por un proceso de fusión por el plasmalema/vesículas de Golgi, esta fusión forma las conexiones plasmodesmales. Los plasmodesmos pueden contribuir a la incompatibilidad del injerto, aunque no son el único mecanismo de compatibilidad.

Otro mecanismo de compatibilidad/incompatibilidad es la formación de conexiones vasculares, considerada para la mayoría de los autores como requisito básico para un injerto exitoso (Moore 1984, Wang y Kollmann 1996). Durante la ontogenia de los injertos (vareta/patrón), la síntesis de proteínas coincide con el desarrollo vascular. Las investigaciones sugieren que en injertos de *Cucumis* y *Cucurbita*, los cambios en el contenido de proteínas puede ser por los polipéptidos que migran por ruta simplástica a través del floema de la unión del injerto (Tiedemann y Carsens-Behrens, 1994). Es posible que la necesidad de reconectar haces vasculares alterados den lugar a la expresión esencial de proteínas, en bajas concentraciones (Schulz, 1990). Además la unión entre vareta/portainjerto se ve afectada por los reguladores de crecimiento, afectando la compatibilidad del injerto. Por ejemplo, la auxina es un regulador muy importante en desarrollo del punto de unión, el cual es liberado de los haces vasculares e inducen la diferenciación de tejidos vasculares (Mattsson et al. 2003). Otros compuestos como los polifenoles también juegan un papel importante en la unión del injerto influyendo en los procesos de lignificación (Haslam, 1979). Las alteraciones causadas por estrés pueden llevar a la acumulación de flavonoides y su degradación por oxidasas (Van Sumere et al. 1985), que influyen en el crecimiento y metabolismo de los tejidos, tales como la inhibición de la vía de la lignina. La síntesis de flavonas puede determinar la incompatibilidad en *Prunus*, tales como la prusina, y puede ser estimulada por el ABA y el AG3 (Moing et al. 1987, Moing y Carde, 1988). Todas las macromoléculas (proteínas, ARN, hormonas) están presentes en la savia del floema y podrían ser importantes durante la diferenciación celular durante los procesos de compatibilidad. Schmid y Feucht (1985) confirmaron que es posible definir la compatibilidad no solo por caracteres morfológicos, sino también por métodos bioquímicos. Gulen et al. (2002) concluyeron que la ausencia

o presencia de peroxidasas en la combinación del injerto de pera y membrillo se puede usar para predecir la reacción de incompatibilidad.

Investigaciones más recientes sugieren que el aumento en actividad de las peroxidasas y catalasas podrían estar involucrados en el desarrollo del injerto de tomate (Fernández-García et al. 2004).

En guayabo existen problemas importantes con el ataque de nematodos, ya que pueden acabar con plantaciones completas, y problemas de fertilidad en los suelos, con lo que se requiere de patrones que solucionen todos o algunos de estos problemas. Existen genotipos que se ubican dentro del mismo género *Psidium* como Cass (*P. friedrichsthalianum*), que por su rusticidad y vigorosidad, es difícil su propagación por semilla, pero tienen la característica de ser tolerantes al ataque de los nematodos; o el genotipo Nayarit (*P. guajava*) que es resistente a deficiencias nutrimentales, principalmente zinc. Además, en México, la producción comercial de guayabo está limitada principalmente a la variedad Media China, por lo que se necesita una diversificación de materiales.

Con base en lo anterior y considerando que la elección del mejor patrón representa uno de los problemas más complejos de la fruticultura, así como la propagación del mismo, el propósito fundamental de la presente investigación fue optimizar el enraizamiento *in vitro* de los portainjertos. Además, se realizó un estudio de detección temprana de compatibilidad mediante un análisis de anatomía, azúcares solubles totales, glucosa, fructosa y sacarosa, y compuestos fenólicos totales, en diferentes selecciones de guayabo que fueron injertadas sobre dos genotipos Cass y guayaba Nayarit, usando dos diferentes tipos de injertos (púa invertida y aproximación).

## 1.2 Objetivos Generales

- Optimizar el enraizamiento *in vitro* de los portainjertos a evaluar Cass y el genotipo Nayarit.
- Determinar la compatibilidad de Cass y el genotipo Nayarit injertados sobre diferentes selecciones de guayaba mediante diversos análisis (anatómico, bioquímico y fitoquímico)

## 1.3 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto del ácido indolbutírico (AIB) durante el enraizamiento *in vitro* de los portainjertos mediante diferentes concentraciones y cinética de enraizamiento.
- Evaluar la anatomía de las diferentes combinaciones de injertos mediante el análisis del xilema secundario de tallo, por debajo y por arriba del punto de unión y en el punto de unión de los injertos.
- Realizar un análisis bioquímico, mediante la cuantificación de azúcares solubles totales, así como la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa, que permitan determinar la compatibilidad o incompatibilidad de las diferentes combinaciones de injertos.
- Realizar un análisis fitoquímico, mediante la determinación de compuestos fenólicos totales que permitan determinar la compatibilidad o incompatibilidad de las diferentes combinaciones de injertos.
- Determinar cuál es el mejor tipo de injerto (púa invertida y aproximación) en las diferentes combinaciones de injertos.

#### **1.4 Hipótesis**

- Es posible mejorar el enraizamiento *in vitro* de los portainjertos Cass y genotipo Nayarit, mediante el uso de ácido indolbutírico (AIB),
- Es posible encontrar un portainjerto adecuado, y que resuelva algunos de los problemas que afectan el cultivo de guayabo, el cual sea fácil de propagar e injertar, mediante un análisis de detección temprana de compatibilidad.

## 1.5 LITERATURA CITADA

- Ehlers K, Kollmann R, (2001) Primary and secondary plasmodesmata: structure, origin, and functioning. *Protoplasma* 216 (1–2), 1–30.
- Fahn A (1978) *Anatomía Vegetal*. Traducción García, F. Madrid, España. 643 p.
- Fernandez-Garcia, N, Carvajal M, Olmos E (2004) Graft union formation in tomato plants: peroxidase and catalase involvement. *Annals of Botany* 93 (1), 53–60.
- Gulen H, Arora R, Kuden A, Krebs SL, Postman J (2002) Peroxidase isozyme profiles in compatible and incompatible pear-quince graft combinations. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127 (2), 152–157.
- Hayes WB (1960) *The guava and it's relatives. Fruit growing in India*. 3ra Edition, Kitabistan, AllaHabad, India. pp. 283-299.
- Jaiarj P, Khoohaswan P, WongKrajang Y, Peungvichia P, Suriyawong P, Saraya ML, Ruangsomboon O (1999) Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. leaf extract. *J. Ethnopharmacol*, 67(2): 203-212.
- Jefree CE, Yeoman MM (1983) Development of intercellular connections between opposing cells in a graft union. *New Phytologist*. 93, 491–509.
- Lozoya X, Reyes-Morales H, Chávez-Soto MA, Martínez-García M del C, Soto-González Y, Doubova SV (2002) Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. *J. Ethnopharmacol.*, 83(1-2): 19-24.
- Mattsson J, Ckurshumova W, Berleth T (2003) Auxin signaling in Arabidopsis leaf vascular development. *Plant Physiology*. 131 (3), 1327–1339.
- Medina ML, Pagano F (2003) Caracterización de la pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) tipo “Criolla Roja”. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, 20: 72-86.
- Miller H, Barnett JR (1993) The structure and composition of bead-like projections on Sitka spruce callus cells formed during grafting and in culture. *Annals of Botany* 72, 441–448.

- Moing A, Carde JP (1988) Growth, cambial activity and phloem structure in compatible and incompatible peach plum grafts. *Tree Physiology*. 4 (4), 347–359.
- Moing A, Salesses G, Saglio PH (1987) Growth and the composition and transport of carbohydrate in compatible and incompatible peach plum grafts. *Tree Physiology* 3 (4), 345–353.
- Monteverde E (1989) Evaluación del naranjo “Valencia” sobre diez patrones en los valles altos de Carabobo - Yaracuy. Calidad del fruto y recomendaciones. Maracay Venezuela. FONAIAP Divulgación N°32 Julio-Diciembre. 5 p.
- Moore R (1984) A model for graft compatibility-incompatibility in higher plants. *Am. J. Bot.* 71, 751–758.
- Pages R (2004) Fruits take their rightful place. *Granma Internacional*, Diciembre 30, 2004. (Edición digital en inglés). Disponible en: <http://www.granma.cu/ingles/2004/diciembre/juev30/51frutales.html>.
- Peña HA, Díaz JA, Martínez TR (1996) *Fruticultura Tropical*. 2<sup>da</sup> parte. ICFES. Santa Fe de Bogotá. Colombia. 208 p.
- Pérez AT, Nápoles L, Concepción O, Trujillo R (2002) Multiplicación *in vitro* de brotes de guayabo (*Psidium guajava* L.) cv. Enana Roja Cubana obtenidos a partir de semillas. *Cultivos Tropicales* 23 (3): 57-61.
- Popenoe W (1974) *Manual of tropical and subtropical fruits: excluding the banana, coconut, pineapple, citrus fruits, olive and fig*. Reimpreton. Ed. Por Hafner Press. New York, USA. 474p.
- Schmid PPS, Feucht W (1985) Compatibility in *Prunus avium*/*Prunus cerasus* graftings during the initial phase. III. Isoelectrofocusing of proteins, peroxidases and acid phosphatases during union formation. *Journal of Horticultural Sciences* 60 (3), 311–318.
- Schulz A (1990) Wound-sieve elements. pp. 199–217. In: Behnke, H.D., Sjolund, R.D. (Eds.), *Sieve Elements: Comparative Structure, Induction and Development*. Springer, Berlin.

- Tiedemann R, Carsens-Behrens U (1994) Influence of grafting on the phloem protein patterns in Cucurbitaceae. I. Additional phloem exudate proteins in *Cucumis sativus* grafted on two *Curcubita* species. *Journal Plant Physiology* 143, 189–194.
- Van Sumere CF, Vande Castele K, de Loose R, Heursel J (1985) Reverse phase-HPLC analysis of flavonoids and the biochemical identification of cultivars of evergreen *Azalea*. *The Biochemistry of Plant Phenolics*, 25. Clarendon Press, Oxford. pp. 17–44.
- Wang Y, Kollmann R (1996) Vascular differentiation in the graft union of in vitro-grafts with different compatibility. Structural and functional aspects. *Journal Plant Physiology*. 147, 521–533.
- Yeoman MM (1984) Cellular recognition systems in grafting. In: Linkskens, H.F., Heslop-Harrison, I. (Eds.), *Cellular Interaction, Encyclopaedia of Plant Physiology, New Series*, vol. 17. Springer-Verlag, Berlin. pp. 453–472.

## CAPÍTULO II

### 2.1 REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1.1 Origen del género *Psidium*

El origen del guayabo (*Psidium guajava* L.) es difícil de determinar debido a la gran diversidad fenotípica tanto en árboles como en frutos (Nieto, 1996; Salinas 1998). Probablemente tiene su origen en el trópico americano (Bourke, 1975) debido a las más de 140 especies de *Psidium* presentes en América, que se distribuyen desde México, Centroamérica hasta el Perú y sólo una pequeña porción es de la India. Diversos autores coinciden en señalar a México como uno de los centros de origen por su gran variabilidad de tipos de guayaba (Hayes, 1960; Popenoe, 1974; Mata y Rodríguez, 2000). Otros autores refieren que la domesticación de la guayaba se realizó en Perú desde hace varios miles de años, debido a que se han encontrado sus semillas en sitios arqueológicos peruanos (Smith, 1988).

La guayaba Cass (*Psidium friedrichsthalianum*) es originaria de Centroamérica. El vocablo cass es un nombre indígena costarricense y es nombrado como guayaba costarricense, también conocido como guayaba agria en otros países, entre ellos Colombia (León, 1987); en Nicaragua se lo conoce como guayaba de fresco (Barbeau, 1990).

#### 2.1.2 Clasificación Taxonómica

El guayabo pertenece al Reino Plantae, Subreino Fanerogamae, Subdivisión Lignosae, Clase Angiospermae, Subclase Dicotiledoneae, Orden Myrtaceae, Genero *Psidium*,

Especie guajava (González et al., 2002). La familia Myrtaceae, representada en su mayoría por árboles y arbustos, cuenta con más de 3800 especies distribuidas en aproximadamente 133 géneros (Wilson et al., 2001; Sytsma y Litt, 2002), que prosperan en la mayor parte de las áreas tropicales y subtropicales del mundo (Mata y Rodríguez, 2000).

El género *Psidium* comprende aproximadamente 150 especies; donde se ubican a *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg.) Nied. (Mata y Rodríguez, 2000).

### **2.1.3 Importancia del cultivo de guayabo**

El guayabo es de menor importancia económica si se compara con otras especies frutícolas, pero desde el punto de vista ecológico es muy importante debido a que se distribuye a través de los trópicos y subtropicos de más de 50 países en el mundo.

De acuerdo con la SAGARPA (2014) en México se produce guayaba en 19 estados, con una superficie sembrada de 20,899 ha. Los principales productores: Michoacán, Aguascalientes y Zacatecas, con 9,448.63, 6,268.20 y 3,040.12 ha, con un rendimiento de 14.93, 15.87 y 16.40 ton.ha<sup>-1</sup>, respectivamente. Los principales países productores de guayaba son: India, Pakistán, México, Bangladesh, Brasil y Cuba.

El tipo de guayabo predominante en las plantaciones es el criollo, conocido como 'Media China' (Padilla et al., 2002). En lo que respecta a la importancia social y económica del cultivo en México, radica en la demanda de mano de obra que requiere, con un promedio de 180 jornales/ha/año. La mayoría de las huertas son de tamaño pequeño, el promedio de cada huerta es de 3 a 5 ha, por lo que el número de productores es elevado, se reporta que hay más de 7,000 productores a nivel nacional (Padilla, 2007).

## **2.1.4 Descripción morfológica**

### **2.1.4.1 Guayaba (*Psidium guajava* L.)**

El guayabo es un árbol bajo o un arbusto arborescente de 3 a 10 m de altura, con el tronco corto y ramas cerca de la superficie del suelo que varían de 10 a 30 cm de diámetro, frecuentemente produce una gran cantidad de “hijuelos” en la base del tronco cerca de la base de la raíz (El-Baradi, 1975, Mata y Rodríguez, 2000).

El árbol crece simétricamente y presenta forma de domo. La corteza es lisa, tersa y de color café rojizo oscuro; y ésta se desprende en delgadas escamas (González et al., 2002). Las ramas jóvenes al inicio portan alas angostas en los cuatro lados; más tarde se convierten en tetragonas de color verde amarillo y frecuentemente de color rojizo y están cubiertas de fina vellosidad. Las ramas completamente desarrolladas se tornan de color café rojizo claro, opacas, lisas y con lenticelas.

La raíz destaca por su gran capacidad de anclaje, por lo que se le ha comparado con *Litchi chinensis*. Tiene gran cantidad de raíces de 1 mm de diámetro o más, por lo que dispone de un gran poder de succión. El sistema radical es muy superficial, pero el árbol lo compensa con la extensión y el número de raíces, las cuales sobrepasan la proyección de la copa del árbol (Mata y Rodríguez, 2000).

Las hojas son de color amarillo verdoso, simples, opuestas, de peciolo corto y semirredondo de 0.3 a 1.5 cm de largo, ovaladas o elíptica-oblongas, la base obtusa, redonda o subcordada, el ápice obtuso, acuminado o recortado o puntiagudo entero. Las hojas miden de 5 a 18 cm de largo y de 3.0 a 6.5 cm de ancho, tienen de 10 a 25 pares de nervaduras laterales que son hundidas en el haz y prominentes en el envés, y se arquean cerca del margen (González et al., 2002). Tienen pubescencia fina en el envés, especialmente cuando son jóvenes (Ochse, 1976).

Las flores son hermafroditas y pediceladas, con un diámetro aproximado de 3.8 cm. Nacen solitarias o en racimos de dos a tres, en las axilas de las hojas que se encuentran en los crecimientos del año o de la estación en curso; rara vez son terminales. El pedicelo es redondeado, de 2 a 4 cm de largo y de color verde amarillento. El tubo del cáliz es turbado y algunas veces ovoide, no se produce más allá del ovario y de 0.6 a 0.7 cm de largo. Las brácteas son subuladas y pubescentes. Los cuatro o cinco pétalos, son abovados, blancos, cubiertos de pubescencia densamente apretada en ambas superficies o lisos por dentro y de 1.5 a 2.0 cm de largo. Los estambres son numerosos y tienen mucho polen; se encuentran insertados en hileras alrededor del disco y desarrollan una longitud de 1 a 1.5 cm; los filamentos son blancos y las anteras son ovoidea-oblongas o elipsoidales de color amarillo claro. El estilo es filiforme, liso, de color verde amarillento (Ochse, 1976; Mata y Rodríguez, 2000; González et al., 2002).

El fruto es una baya esférica, globulosa, elipsoidal o periforme, rugosa o lisa y punteada; sus dimensiones varían de una variedad a otra. La baya resulta del desarrollo conjunto de las paredes del receptáculo y de los tejidos del ovario; conserva en el ápice los restos del cáliz y aún del pistilo (Mata y Rodríguez, 2000). El color del fruto en su plena madurez es amarillo verdoso o amarillo claro en su exterior, de 5 a 12 cm de largo y de 5 a 7 cm de ancho, su peso es de 25 a 450 gramos; sin embargo, se tienen registros de frutos de hasta de 862 gramos, obtenidos en Fort Valley, Georgia, Estados Unidos. La pulpa es jugosa, de color amarillento, rosado o rojo intenso, con sabor dulce notoriamente almizclado y aromático (González et al., 2002). El fruto varía de pericarpio delgado con muchas semillas a pericarpio grueso con pocas semillas. En la epidermis y el mesocarpo se hallan células duras, esclereidas solas o en grupos, que le dan la consistencia arenosa característica. En el ovario generalmente hay cuatro lóculos con abundantes semillas (Mata y Rodríguez, 2000). Las semillas son numerosas, pétreas, triangulares, reniformes,

pequeñas, de color blanco, amarillo claro o café amarillento de 0.3 a 0.5 cm de largo y de 0.2 a 0.3 cm de ancho (Yadava, 1996).

#### **2.1.4.2 Cass (*Psidium friedrichsthalianum*)**

Cass es un árbol de tamaño pequeño a mediano, algunos llegan a medir hasta 7 m de altura, con un hábito de crecimiento similar a *P. guajava*, sin embargo, es más sensible a las heladas, ya que no soporta periodos largos a bajas temperaturas. La corteza es lisa y de color marrón oscuro. Las ramas jóvenes son cuadrangulares, de color rojizo, con pocos tricomas. Las hojas son ovalares oblongas, de 3.5-7.5 cm de largo, de color verde oscuro brillante en la haz, y verde claro en el envés, que está cubierto de pequeños tricomas muy finos. El ápice de la hoja es acuminado y la base es aguda. La nervadura central es prominente. Flores individuales de color blanco que crecen en las axilas de las hojas, miden alrededor de 2.5 cm de ancho. Cada flor tiene cinco pétalos de aspecto ceroso, un estigma y ovario inferior con cinco lóculos. Los frutos son pequeños, de color amarillo oscuro, globosos o ligeramente ovalados, de 3.8 a 6.4 cm de ancho, algunos frutos con muy poca semilla de 2 a 4. La epidermis de los frutos es delgada, y la pulpa es suave, blanca, muy ácido, y tiene un alto contenido de pectina (Tong y Khay, 1990).

#### **2.1.5 Métodos de propagación del guayabo**

##### **2.1.5.1 Propagación sexual**

La propagación sexual o uso de semillas como medio para incrementar la población de una especie o cultivar, además de ser la forma de propagación natural, es el método comúnmente más usado por viveristas (González et al., 2002).

En algunos países la propagación por semilla es el principal método para obtener plantas de guayaba, las cuales son utilizadas para huertas comerciales. (Mata y Rodríguez, 2000).

Sin embargo, los árboles obtenidos por este método aun cuando son muy vigorosos,

tardan más tiempo para entrar a producción, debido a su largo periodo de juvenilidad (Hartman y Kester, 1971), además de las plantas de las huertas presentan una alta variabilidad genética, los árboles presentan diferentes portes y tipos de frutos en tamaño, forma y color, entre otras características (Galletta, 1988). La propagación sexual en México se hace únicamente en la propagación del portainjerto *Psidium friedrichsthalianum*, el cual, además de tener ciertas características de tolerancia a factores adversos como nemátodos y marchitamiento (Mata y Rodríguez, 2000), es compatible para injertar sobre él las variedades seleccionadas para la producción comercial. Sin embargo, las semillas de Cass se consideran de dificultad media para germinar, ya que necesitan un mínimo de 4 a 6 semanas, lo que lo hace un método lento.

#### **2.1.5.2 Propagación asexual**

La propagación asexual del guayabo consiste en la reproducción de individuos a partir de porciones vegetativas de las plantas que la capacidad de regeneración, como ramas e hijuelos. Básicamente en guayabo se ha utilizado como método de propagación secciones de tallo que tienen la capacidad para formar nuevas raíces (estacas), los hijuelos, el acodo, propagación in vitro (ápices) e injertos (González et al., 2002). Recientemente se está promoviendo en México el empleo de la técnica de conexión vascular continua de dos tallos diferentes mediante el uso del injerto.

Uno de los principales métodos por el cual se obtienen plantas de buena calidad para el establecimiento de huertos es mediante estacas (González et al., 2002). Para ello se necesita que se desarrolle un nuevo sistema de raíces adventicias, debido a que la estaca posee yemas con aptitud potencial para desarrollar nuevos vástagos (Khattak et al., 2001).

La propagación de guayaba por medio de hijuelos de raíz se obtiene cortando las raíces a 1m del tronco; estas producirán hijuelos después se pueden trasplantar a bolsas.

Los acodos se consideran un método de propagación fácil, rápido y económico, evita la transmisión de enfermedades o nemátodos noduladores y mantiene las características de la planta madre (González et al., 1999). Presenta la desventaja de poco vigor de las plantas y un pobre sistema radical (Zeledon y Wan, 1994).

### **2.1.6 Propagación in vitro de guayabo**

En guayabo, las técnicas del cultivo in vitro han mostrado resultados ventajosos con respecto a métodos convencionales, ya que se puede propagar masivamente a la especie, y serán genéticamente iguales y libres de enfermedades.

Los trabajos existentes sobre micropropagación señalan a la organogénesis como la principal vía morfogénica, a partir de yemas vegetativas preexistentes. Loh y Rao (1989) cultivaron in vitro algunas variedades de guayabo a partir de secciones de plántulas y también a partir de tejido adulto utilizando segmentos nodales. Sin embargo, la regeneración de estas plantas al utilizar material adulto, al igual que ocurre con un gran número de especies leñosas, presentan problemas, principalmente durante la etapa de iniciación y durante la etapa de enraizamiento (Fitchet, 1990).

### **2.1.7 Propagación por injerto**

El termino injerto es definido como la técnica por la cual se unen dos partes de diferentes plantas, de manera que puedan seguir su crecimiento como una sola planta; así, se implanta una variedad adecuada a las exigencias del mercado (Perales, 2001) sobre otro individuo (portainjerto) que tenga las características de tolerancia a factores adversos, como es el caso de la especie *Psidium friedrichsthalianum* para el cultivo del guayabo, o bien, mejorar la producción, resistentes a plagas. Así como brindar un mejor sistema radical más fuerte o adaptado al medio (Geilfus, 1989).

### **2.1.7.1 Época de injertación**

La época más oportuna para injertar en el cultivo del guayabo, se considera que es cuando baja el flujo de savia, lo cual sucede cuando el árbol está en floración y hasta dos semanas después, esto dependerá también de la región y de las condiciones de humedad bajo las que se encuentre el cultivo (Perales, 1995).

De acuerdo con González et al. (2002) se requieren de ciertas condiciones para tener éxito en el injerto de guayabo incluyendo: afinidad entre el patrón y el injerto, esto es que sean compatibles ambas partes, el diámetro de los tallos deben ser superior al diámetro de un lápiz; regar los árboles de 3 a 4 días antes de ser injertados; realizar los injertos antes del medio día o por la tarde, después de las horas más calurosas del día y evitar realizar los injertos en días con vientos fuertes y polvaderas.

Según Hartmann y Kester (1987) mencionan que previo a la cicatrización de los injertos y para que esta sea adecuada se recomienda seguir los siguientes pasos:

- 1) Establecimiento de un contacto íntimo de la región cambial del patrón y de la púa en condiciones ambientales favorables, lo cual es controlado por el injertador.
- 2) Producción y entrelazamiento de las células de parénquima (tejido de callo) producido por el cambium del patrón y de la púa.
- 3) Producción de nuevo cambium vascular en el punto de unión (callo).
- 4) Formación de nuevo xilema y floema a partir del nuevo cambium vascular producido en el callo, con lo que queda conectado el sistema conductor de ambas partes.

### **2.1.7.2 Técnicas de injertación**

Existen diferentes técnicas de injertación que se han probado en guayabo, como los injertos de yema en “T” invertida, y el injerto de “hendidura lateral”. Cuando la técnica

de injertación no es la adecuada, el crecimiento nuevo mantiene una tasa de respiración que se ve incrementada por las temperaturas de la época, y no recibe la cantidad de agua necesaria a través de la limitada superficie conductora, por lo que subsecuentemente muere (Hartmann y Kester, 1987).

### **2.1.7.3 Uso de portainjertos en guayabo**

Es posible obtener clones que permitan regular el tamaño de las plantas, como el uso de portainjertos enanizantes, si es aplicable a guayabo como a manzano, se habrá dado un gran paso, con lo cual las posibilidad de usar portainjertos en plantaciones a alta densidad. Se cree que *P. pumilum*, puede tener un efecto enanizante por sus características (Mata y Rodríguez, 2000).

En algunos países se reportan problemas con nematodos que afectan la producción de guayabo, varios autores señalan la importancia de los nemátodos sobre el deterioro de árboles y reducción de la producción de guayaba. Avelar et al. (2001), encontraron asociación entre el grado de ataque de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* y la enfermedad denominada declinamiento, la cual reduce el tamaño de los árboles, del fruto y por lo tanto de la producción. Por la magnitud de los daños ocasionados por nematodos en guayabo, Cuadra y Quincosa (1982) consideraron importante desarrollar patrones resistentes al ataque de nematodos. *Psidium friedrichsthalianum* es una especie tolerante a nematodos (Bocantes- Arias y Mora- Newcomer, 2010).

Otros efectos. Se ha encontrado que cuando *P. guajava* se injerta sobre *P. catteianum* se incrementa el crecimiento y rendimiento del injerto, en comparación con plantas no injertadas (Teaotia y Phogat, 1971). También se ha observado que *P. cujavillus*, como portainjerto, incrementa el contenido de ácido ascórbico (Singh, 1978). Y el tamaño de frutos aunque éstos crecen sin uniformidad y con la piel rugosa, mientras que *P. pumilium*

incrementa los sólidos solubles totales y los azúcares totales. Sin embargo, estas son algunas pruebas y aún no se tienen portainjertos comerciales en guayabo (Mata y Rodríguez, 2000).

#### **2.1.7.4 Posibles portainjertos para guayabo**

Dentro de las especies del género *Psidium* que se cultivan en varias partes del mundo están *P. guineense*, Sw., *P. polycarpum* Lamb., *P. molle*, Berthol., *P. coriaceum* Mart., *P. friedrichsthalianum* (Beng.) Nied., *P. araca* Raddi, *P. cattleianum* y *P. cujavillus* Burm. Muchas de estas especies pueden ser importantes con fines de seleccionar patrones y realizar mejoramiento genético. *P. cattleianum* es considerada como la especie que más tolera bajas temperaturas, ya que las plantas han resistido temperaturas de  $-5^{\circ}\text{C}$  (Ochse et al., 1972). *P. angulatum*, es considerada una planta rústica que se adapta fácilmente, que crece de forma silvestre en Brasil cuyos frutos son ácidos pero tienen una forma conocida como “Aracá-Pera” de alta producción (Arkcoll, 1990).

#### **2.1.8 Compatibilidad de injertos**

Se denomina compatibilidad a la capacidad de dos plantas diferentes, que injertadas entre sí llegan a producir con éxito una unión y desarrollarse como una planta única (Mosse, 1962). La compatibilidad de injertos en plantas está dado por el reconocimiento celular de las partes injertadas y la continuidad de los tejidos vasculares en la parte de unión del injerto (Yeoman et al., 1978). Cuando hay compatibilidad en los injertos se observa una buena conexión y formación de un nuevo xilema secundario en la zona de unión (Simons, 1987). El nuevo callo se desarrolla homogéneo y el tejido vascular se diferencia rápidamente, asimismo se establece un contacto fuerte en ambos componentes, en donde la masa de células que forman el callo es más compacta y con una disposición regular y organizada, en tanto que la pared del callo es más delgada y además presenta espacios

extracelulares más pequeños (Errea et al., 1994). Cuando hay compatibilidad en los injertos hay poco o escasos compuestos fenólicos en el punto de unión (Errea, 1998).

La compatibilidad de los injertos es determinada, según Mosse y Herrero (1951), de acuerdo a la estructura anatómica del punto de unión en cuatro grupos:

- 1) Unión perfecta: La línea entre los tejidos del injerto pueden ser visto en tejidos de madera y corteza, y la unión del injerto está libre de capas necróticas.
- 2) Buena unión: La línea entre los sectores del injerto pueden ser vistos pero los tejidos de la madera y corteza son continuos.
- 3) Unión de injerto con discontinuidad de la corteza: Los tejidos de la madera en la unión del injerto así como los de la corteza no es continuo y se presenta una capa de color negro en el punto de unión del injerto.
- 4) Unión de injerto con discontinuidad en la madera y corteza: Las células del parénquima no lignificado son encontrados en el tejido de madera de tal manera que también pueden ser vistos los anillos a un año de edad.

### **2.1.9 Incompatibilidad en injertos**

La incompatibilidad de injertos no tiene que ver con un fracaso del injerto, que puede ser causado por muchos factores, o por condiciones adversas al ambiente, así como la falta de habilidad del injertador (Andrews y Serrano-Marquez, 1993).

La incompatibilidad puede ser definida como la incapacidad de dos plantas diferentes que al ser injertadas entre sí no se logra el éxito en la unión y el injerto no se desarrolla y muere. También ocurre incompatibilidad cuando hay ruptura en el punto de unión del injerto, generalmente cuando ha estado creciendo durante varios años (Mosse, 1962).

Desde un punto de vista anatómico la incompatibilidad se define como la ausencia de desarrollo normal de los tejidos vasculares en la unión del injerto, una incompleta lignificación de los tejidos en radios lo que resulta en una interrupción en el cambium y en la continuidad vascular (Mosse, 1962).

Feucht (1988) define el concepto de incompatibilidad como un fenómeno de senescencia prematura causada por procesos fisiológicos y bioquímicos, aunque también puede ser descrita como una inestabilidad fisiológica, que se acentúa bajo condiciones de estrés (Gebhardt y Feuch, 1982). La incompatibilidad constituye un problema en la fruticultura, el cual se caracteriza por una disminución del crecimiento, necrosis celular y muerte del injerto (Moore, 1986). La mayoría de los síntomas característicos de la incompatibilidad es por la rotura o defecto en la estructura del punto de unión del injerto, es por eso que las investigaciones anatómicas tienen un papel importante en el estudio de injertos (Mosse, 1962).

Generalmente la incompatibilidad se presenta a medida que las plantas se alejan taxonómicamente, y puede ser dentro de un cultivar, entre cultivares de una sola especie, entre especies de un género, entre géneros de una familia o entre familias; si bien el éxito del injerto con frecuencia puede ser específico (Simons, 1985).

#### **2.1.9.1 Síntomas de incompatibilidad**

Las anormalidades anatómicas del punto de unión de los injertos es el resultado de una incompatibilidad y se relaciona con algunos síntomas externos o aspectos morfológicos como el prendimiento nulo de la púa injertada; clorosis y/o pérdida de color de las hojas; senescencia prematura de las hojas; amarillamiento en las hojas y declinación del crecimiento vegetativo; crecimiento reducido, muerte prematura del injerto, desarrollo

excesivo de la unión, arriba o debajo de ella, ruptura por la unión del injerto (Mosse, 1962).

### **2.1.9.2 Tipos de incompatibilidad**

La incompatibilidad del injerto ha sido clasificada en dos tipos: localizada y traslocada (Herrero, 1951; Mosse, 1962).

Incompatibilidad traslocada: Los síntomas que se asocian a la incompatibilidad traslocada es el envejecimiento prematuro de hojas y alteraciones en el sistema radical. Además, se ha observado una degeneración de los tubos cribosos asociados a las células del floema en el punto de unión del injerto, lo que causa un problema en la translocación y acumulación de compuestos.

Incompatibilidad localizada: Esta incompatibilidad se asocia a malformaciones en el punto de unión del injerto, haciendo que sea una unión débil, la cual en un futuro puede llegar a romperse.

### **2.1.10 Factores que influyen en la compatibilidad o incompatibilidad**

#### **2.1.10.1 Anatómicos**

Diversos autores han descrito una secuencia de acontecimiento estructurales durante la primera etapa del injerto en plantas leñosas y herbáceas (Hartmann et al., 2002).

1. Se hace un corte a la vareta con capacidad de actividad meristemática la cual se pone en contacto con el portainjerto con corte similar de tal manera que las regiones del cambium vascular de ambos queden con la mayor proximidad con el fin de interconectarse a través de un callo. Una vez que los dos componentes del injerto (patrón y vareta), están en contacto íntimo, se forma un tejido parenquimoso tanto en la vareta como en el portainjerto para la formación de tejido calloso, llenando los espacios entre los dos componentes que conectan al injerto.

2. Nuevas células del cámbium se diferencian a partir del callo, forman una conexión continua entre vareta y portainjerto.

3. En el último paso del proceso de establecimiento del injerto, el cambium recién formado en el punto de unión del injerto comienza una actividad cambial típica para la formación de nuevos tejidos vasculares. La formación de un nuevo xilema y floema permiten una conexión vascular entre la vareta y el portainjerto.

Para la mayoría de los autores, estos eventos estructurales durante la primera etapa del injerto, se consideran como el requisito básico para un injerto exitoso (Moore y Walker, 1981a, b; Yeoman, 1984; Tiedemann, 1989, Wang and Kollmann, 1996).

El tejido más importante que participa en la unión del injerto y regeneración de tejidos vasculares es el cambium vascular (Gurudi, 1978). El cámbium vascular es un meristemo lateral secundario que presenta una estructura longitudinal y otra radial. El cámbium vascular de tallo produce centripetamente (es decir, hacia la medula caulinar) el xilema secundario y centrifugamente (es decir, hacia la epidermis y la corteza) el floema secundario (Larso, 1994).

El cámbium vascular tiene una las funciones más importantes que es la de formar callo o tejido para cicatrizar la herida hecha durante la injertación. El callo puede formarse a partir de las células parenquimáticas del floema o de los medios vasculares, en general se diferencia a partir de cambium vascular (Carmi et al., 1972). Una vez que ya se realizó el injerto se inicia la división celular del parénquima para formar callo en ambos componentes en la región del cambium (portainjerto y vareta), después las células del parénquima se entremezclan, posteriormente las células del callo se diferencian en nuevas células cambiales conectándose con el cámbium original del portainjerto y la vareta,

finalmente se producen tejidos vasculares del nuevo cámbium, permitiendo así el paso de nutrimentos y agua entre el portainjerto y la vareta (Simons y Chu, 1985).

En muchos de los casos de incompatibilidad en plantas leñosas se manifiesta por la rotura de los árboles en el punto de unión sobre todo cuando han estado creciendo durante algunos años (durazno injertado en diferentes especies del genero *Prunus* y en injertos de pera sobre membrillo) (Pina y Errea, 2005).

En los casos en que la púa y el patrón son incompatibles aparecen entre ellos uniones débiles. Esta debilidad se debe a la disposición anómala de los elementos de xilema. Esto ocurre sobre todo con las fibras que en vez de entrelazarse a través de la unión, se curvan en dirección horizontal o bien quedan separadas por un estrato de tejido parenquimatoso. La discontinuidad de los tejidos vasculares se debe a alguna interrupción en el punto de unión de la actividad cambial normal. En el floema aparecen muchas células necróticas aisladas o en grupos (Hartmann et al., 2002). Las principales características en injertos incompatibles son una conexión vascular débil, acompañada de una aglomeración de células, presencia de tejido parenquimatoso en lugar de xilema secundario en el punto de unión después de un año o más de la injertación (Simons, 1987).

Estudios anatómicos de la formación de la unión del injerto han demostrado que los procesos involucrados son similares en diferentes especies de árboles frutales como en chabacano, durazno, pera y manzano (Errea et al., 1994; Soumelidou et al., 1994; Ermel et al., 1997; Zarrouk et al., 2010).

Pina et al. (2012) caracterizaron las primeras señales celulares de incompatibilidad de injertos del genero *Prunus* basada principalmente en pruebas histoquímicas y cuantificación de la comunicación celular a través de plasmodemas, encontrando adhesión y proliferación de callo producido tanto en injertos compatibles como

incompatibles una semana después de la injertación. Sin embargo, no se observaron formación de nuevo cambium vascular derivado del tejido calloso en injertos incompatibles. Chen et al. (2016) demostraron que la compatibilidad anatómica en injertos de Litchi está relacionada con la formación de tejidos vasculares en el punto de unión del injerto.

#### **2.1.10.1.1. Características anatómicas de la madera de Psidium**

La corteza externa tiene una textura lisa, de color pardo claro, escamas irregulares grises y de 3 a 4 milímetros de grosor. La corteza interna es amarilla, fibrosa amarga y tiene un grosor de 4 milímetros. En lo que respecta a las características macroscópicas la madera con albura y duramen amarillo muy pálido, inodora e insípida, de vetado liso, textura fina, lustre alto e hilo ondulado. En la cara transversal los anillo de crecimiento con poco conspicuos y los poros muy pequeños, abundantes y de distribución difusa, el parénquima no se aprecia y los radios son muy poco visibles, en secciones longitudinales no se distinguen las estructuras. En cuanto a las características microscópicas, la porosidad es difusa con zonas de crecimiento conspicuas de diferentes tamaños, delimitadas por una banda de fibras asociada a vasos de 2 a 4 células de ancho e irregular en contorno y continuidad. El parénquima axial es apotraqueal y paratraqueal. En el parénquima radial, los radios son extremadamente abundantes, encontrándose de 6 a 16 por milímetro y están conformados en uniseriados, biseriados y triseriados, son heterogéneos y muchos se encuentran articulados. Las fibras son fibrotraqueídas de longitud muy corta de 754 a 1392  $\mu\text{m}$ , diámetro mediano de 15 a 24  $\mu\text{m}$  y grosor de pared también mediano de 3 a 5  $\mu\text{m}$  (Ortega et al., 1988).

#### **2.1.10.2 Bioquímicos y fitoquímicos**

Las plantas producen una gran cantidad de metabolitos secundarios y son responsables de diferentes funciones como protección contra insectos y patógenos que puedan afectar

el desarrollo y crecimiento de las plantas. Entre los más importantes se encuentran los compuestos fenólicos, alcaloides, esteroides, cumarinas, terpenoides, flavonoides y aceites esenciales, que varían en su función, biosíntesis, concentración y localización dependiendo de la especie (Valencia, 1995; Beltrán, 1997).

Los compuestos fenólicos desempeñan una amplia variedad de funciones, motivo por el cual han sido estudiados (Treutter, 2005). Errea (1998) menciona la implicación de los compuestos fenólicos en los procesos de incompatibilidad de los injertos. Principalmente por su participación en la ruta de síntesis de la lignina, cuya alteración podría provocar una acumulación que afectaría el desarrollo de conexiones normalmente lignificadas (Buchloh, 1960). La acumulación de estos compuestos relacionados con los problemas de incompatibilidad ha sido estudiada por diferentes investigadores en diferentes especies (Treutter y Feucht, 1991; Errea et al., 2000, 1994, 1992; Musacchi et al., 2000; Usenik et al., 2006).

En estudios realizados en injertos incompatibles de cerezo (*P. avium* sobre *P. cerasus*), han encontrado una acumulación de prunina (compuesto fenólico) en el punto de unión (Treutter et al, 1986; Treutter y Feucht, 1991). Algunas polifenoles inhiben el transporte de auxinas (Eckardt, 2006; Wasson et al., 2006), lo que da como resultados un raquítico crecimiento de injertos incompatibles dado su reducido contenido de auxina, la cual afecta la diferenciación de elementos vasculares como a la lignificación (Mattson et al., 2003).

La prunasina es un glucósido cianogénico, encontrado en el floema en injertos incompatibles de algunos cultivares de peral sobre membrillo (Gur et al., 1968). Los tejidos del peral descomponen la prunasina en la región del injerto mediante la acción enzimática de la  $\beta$ -glucosidasa, siendo el ácido cianhídrico uno de los productos de la descomposición. La presencia de ácido cianhídrico lleva a la falta de actividad cambial

en la región de unión del injerto, resultando en marcadas alteraciones en el floema y xilema de esa región. Los tejidos por arriba y en el punto de unión son afectados de tal forma que la conducción de agua y fotoasimilados se ven seriamente reducidos. Moore (1984) encontró que el ácido cianhídrico induce necrosis celular en la interfase celular del injerto, impidiendo la morfogénesis que lleva al desarrollo de la unión. Sin embargo, la presencia de glucósidos cianogénicos en plantas leñosas está relativamente restringida a pocos géneros, por lo que no se puede considerar que esta sea una causa universal de incompatibilidad de injerto (Hartmann et al., 2002).

### 2.1.11 LITERATURA CITADA

- Andrew PK, Serrano-Marquez CS. 1993. Graft incompatibility. Horticultural Reviews 15:183-231.
- Arkcoll D. 1990. New crops from Brazil. Pp. 367-371. In: Advances in new crops. Janick and JE Simon (eds) Timber Press.
- Avelar MJ, Téliz OD, Zavaleta ME. 2001. Patógenos asociados con el “declinamiento del guayabo”. Revista mexicana de Fitopatología. 19(2): 223-229.
- Barbeau G. 1990. Frutas tropicales en Nicaragua. Ed. Ciencias Sociales. Dirección General de Técnicas Agropecuarias. Managua. Nicaragua. 397 p.
- Beltrán L. 1997. Revisión bibliográfica: La Alelopatía: ¿Ciencia o Fenómeno? Cultivos Tropicales. 18 (3):47-58.
- Bogantes-Arias A.; Mora- Newcomer E. 2010. Evaluación de cuatro patrones para injertos de guayaba (*Psidium guajava* L.). Agronomía Mesoamericana. 21(1): 103-111.
- Bourke ODD. 1975. *Psidium guajava* L. guava. Commonwealth bureau of horticulture and plantation crops. New York, USA. pp 530-553.
- Buchloh G. 1960. The lignification in stock-scion junctions and its relation to compatibility. In: Pidham, J.B. Ed. Phenolics in plants in health and disease. Pergamon Press. 93(3):247
- Carmi A, Sachs T, Fahn A. 1972. The relation of ray spacing to cambial growth. New. Phytologist. 71:349-353.
- Chen B, Jietang Z, Yonghua Q, Guibing H. 2016. Study on the graft compatibility between ‘Jingganghongnuo’ and other litchi cultivars Zhe. Scientia Horticulturae. 199:56–62.
- Cuadra R, Quincosa A, 1982. Comportamiento de diferentes especies de guayabo (*Psidium guajava* L.) como patrones resistentes a *Meloidogyne sp.* Revista de la Facultad de Ciencias Agrícolas, Cuba. 1(13)19-26.
- Eckardt NA. 2006. The role of flavonoids in root nodule development and auxin transport in *Medicago truncatula*. Plant Cell. 18(7): 1539-1540.

- El- Baradi TA. 1975. "Guava: review article", *Abstr. Trop. Agric.* 1: 9-16.
- Ermel FF, Poessel JL, Faurobert M, Catesson AM. 1997. Early scion/stock junction in compatible and incompatible pear/pear and pear/quince grafts: a histo-cytological study. *Annals Botany.* 79: 505–515.
- Errea P, Felipe A, Herrero M. 1994. Graft establishment between compatible and incompatible *Prunus* spp. *Journal of Experimental Botany.* 45(272):393-401.
- Errea P, Gutmann M, Feucht W. 2000. Physiological implications of flavan-3-ols in apricot-rootstock combinations. *Advances in Horticultural Science.* 14(3): 126-134.
- Errea P, Treutter D, Feucht W. 1992. Specificity of individual flavan 3-ols interfering with the grafting stress of apricots. *Angewandte Botanik.* 66: 21-24.
- Errea P. 1998. Implications of phenolic compounds in graft incompatibility in fruit tree species. *Scientia Horticulturae.* 74:195-205.
- Feucht W, Treutter D, Schmid PPS. 1988. Inhibition of Growth and Xylogenesis and Promotion of Vacuolation in *Prunus* Callus by the Flavanone Prunin. *Plant Cell Reports.* 7(3): 189-192.
- Fitchet M. 1990. Tissue culture of guava. *Horticultural Abstr.* 60(2): 1500.
- Galletta GJ. 1988. Manejo de polen y semillas. pp. 27 -6. In: Moore, J. N. y Janick, J. *Métodos genotécnicos en frutales.* Traducido por: Mosqueda R. AGT Editor S. A. México.
- Gebhardt K, Feucht W. 1982. Polyphenol Changes at the Union of *Prunus-Avium Prunus-Cerasus* Grafts. *Journal of Horticultural Science.* 57(3): 253-258.
- Geilfus F. 1989. El árbol al servicio del agricultor, manual de agroforestería para el desarrollo rural. Vol. 1: Principios y técnicas. ENDA Caribe y CATIE. Santo Domingo R. 792 p.
- González GE, Esquivel V, Perales C MA, Padilla RJS. 1999. Acodo aéreo en guayabo. SAGAR. INIFAP. Desplegable No. 29. 17 p.
- González GE, Padilla RS, Reyes ML, Perales CMA, Esquivel VF. 2002. Guayaba su cultivo en México. INIFAP. Aguascalientes. 182p.

- Gur A, Samish RM, Lifshitz E. 1968. Role of Cyanogenic Glycoside of Quince in Incompatibility between Pear Cultivars and Quince Rootstocks. *Horticultural Research*. 8(2): 113-&.
- Guridi GL. 1978. Estudio comparativo de la anatomía de la madera en algunas sapotáceas mexicanas. *Ciencias Forestales*. 3: 13-35.
- Hartmann HT, Kester DE, Davies, FT, Geneve, RL. 2002. eds, *Plant Propagation. Principles and practices*, ed 7, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. pp. 411-460.
- Hartmann HT, Kester DE. 1987. *Propagación de plantas*. 2da Ed. Traducido por Marino Antonio Ambrosio, Continental México, D.F., México. 570p.
- Hartmann HT, Kester ED. 1971. *Propagación de plantas. Principios y práctica*. Traducido por: Marino A. Ed. C.E.C.S.A. México, D.F. pp. 141-223.
- Hayes WB. 1960. The guava and it's relatives. *Fruit growing in India* 3ra Edition, Kitabistan, AllaHabad, India. pp. 283-299.
- Herrero J. 1951. Studies of compatible and incompatible graft combinations with special reference to hardy fruit trees. *Journal Horticulture Science*. 26 (3): 186-237.
- Khattak MS, Malik MN, Khan MA. 2001. Macro-propagation of Guava (*Psidium guajava* L.) *Journal of Biological Sciences*. 1(3): 111-112.
- Larso P. 1994. *The vascular cambium: Development and structure*. Springer-Verlag. Germany. 725p.
- Leon J. 1987. *Botánica de los cultivos tropicales*. Ed. IICA. San José. Costa Rica. 445 p.
- Loh CS, Rao AN. 1989. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from seedlings and grafted plants and adventitious shoot formation in vitro. *Scientia Horti*. 39:31-39.
- Mata BI, Rodríguez MA. 2000. *Cultivo y producción del guayabo*. Ed. Trillas, D. F., México. 160p.
- Mattsson J, Ckurshumova W, Berleth T. 2003. Auxin signaling in Arabidopsis leaf vascular development. *Plant Physiology*. 131(3): 1327-1339.

- Moore R, Walker DB. 1981a. Studies on vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. I. A structural study of a compatible autograft in *Sedum telephoides* (Crassulaceae). *American Journal of Botany*. 68: 820-830.
- Moore R, Walker DB. 1981b. Studies on vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. II. A structural study of an incompatible heterograft between *Sedum telephoides* (Crassulaceae) and *Solanum pennelli* (Solanaceae). *American Journal of Botany*. 68: 831-842.
- Moore R. 1984. Ultrastructural Aspects of Graft Incompatibility between Pear and Quince *In vitro*. *Annals of Botany*. 53(3): 447-451.
- Moore R. 1986. Graft incompatibility between pear and quince: the influence of metabolites of *Cydonia oblonga* on suspension cultures of *Pyrus communis*. *Ann. J. Bot.* 173: 1-4.
- Mosse B. 1962. Graft incompatibility in fruit trees. Technical Communication of the Commonwealth Bureau of Horticultural Plant Crops. 28, 1-36.
- Mosse EB, Herrero J. 1951. Studies on compatibility between some pear and quince grafts. *Journal Horticulture. Science*. 26:238-245.
- Musacchi S, Pagliuca G, Kindt M, Piretti MV, Sansavini S. 2000. Flavonoids as markers for pear-quince graft incompatibility. *Journal of Applied Botany-Angewandte Botanik*. 74(5-6): 206-211.
- Nieto AD. 1996. Fisiología, bioquímica y patógenos en frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados, México. 111p.
- Ochse JJ, Soule JM, Dijkman J, Wehlburg C. 1972. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Vol. 1. Ed. Limusa. 828 p.
- Ochse JJ. 1976. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales, vol. I. Limusa. México. 1536 p.
- Ortega F, Guerrero L, Carmona T, Córdova C. 1988. Angiospermas arbóreas de México. Núm. 1. Anatomía de la madera de 28 especies de Casautlán de Carvajal, Veracruz. *Boletín Técnico, la madera y su uso* Núm. 19. UAM Atzacapotzalco, D.F. 206 p.

- Padilla RJS, González GE, Esquivel VF, Mercado SE, Hernández DS, Mayer PN. 2002. Caracterización del germoplasma sobresaliente de guayabo de la región Calvillo-Cañones, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 25(4): 393-399.
- Padilla RJS. 2007. Colecta, caracterización, conservación y aprovechamiento del germoplasma mexicano de *Psidium guajava* L. pp. 119-125. In: *Frutales nativos, un recurso filogenético de México*. Nieto, A. R. (editor). UACH, Chapingo, México.
- Perales de la C. M. A. 2001. Métodos de injertos para el pistachero en Aguascalientes. Folleto para productores. Pabellón, Aguascalientes, México. 52p.
- Perales de la CMA. 1995. Evaluación de métodos de injertación y compatibilidad de selecciones de *Psidium guajava* con el portainjerto *P. friedrichsthalianum* en Huanusco, Zac. Informe anual de investigación. INIFAP-CIRNOC. Campo Experimental Valle de Juárez. Praxedis G. Guerrero, Chihuahua. México. 9p.
- Pina A, Errea P, Martens HJ. 2012. Graft union formation and cell-to-cell communication via plasmodesmata in compatible and incompatible stem unions of *Prunus* spp. *Scientia Horticulturae*. 143: 144–150.
- Pina A, Errea P. 2005. A review of new advances in mechanism of graft compatibility-incompatibility. *Science Horticulture*. 106:1-11.
- Popenoe W. 1974. *Manual of tropical and subtropical fruits: excluding the banana, coconut, pineapple, citrus fruits, olive and fig*. Reimprention. Ed. Por Hafner Press. New York, USA. 474p.
- SAGARPA. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Consultado 15 de enero de 2016. Disponible <http://www.siap.gob.mx/>.
- Salinas HRM. 1998. Efecto del grado de madurez, encerado y frigoconservación sobre la maduración y calidad de la guayaba Media China. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. México. 146p.
- Simons RK, Chú MC. 1985. Graft unión characteristics of M26 apple rootstock combined with 'Red Delicious' strains. Morphological and anatomical development. *Scientia Horticulture*. 25: 48:59.

- Simons RK. 1987. Compatibility and stocks-scion interactions as related to dwarfing. Rootstock crops. 79-106.
- Singh UR. 1978. Propagation of guava by budding. Hort. Abstr. 50(5):37-62.
- Smith CE. 1988. Evidencia arqueológica actual sobre los inicios de la agricultura en América. Pp. 91-112. In: Coloquio V, Gordon C, Manzanilla G (eds.) UNAM. México.
- Soumelidou K, Battey NH, John P, Barnett JR. 1994. The anatomy of the developing bud union and its relationship to dwarfing in apple. Annals Botany. 74, 605–611.
- Sytsma KJ, Litt A. 2002. Tropical disjunctions in and among the Myrtaceae clade (Myrtaceae, Heteropyxidaceae, Psiloxylaceae, Vochysiaceae): Gondwanan vicariance or dispersal (Abstract). Botany 2002 Conference, University of Wisconsin, Madison, WS, USA, August. pp. 4-7.
- Teaotia SS, Phogat KPS. 1971. Effect of root stocks on growth, yield and quality in guava *Psidium guajava*. Hort. Abstr. 43(8):5626.
- Tiedemann R. 1989. Graft union development and symplastic phloem contact in the heterograft *Cucumis sativus* on *Curcubita ficifolia*. J. Plant Physiology. 134, 427-440.
- Tong KL, Khay CK. 1990. Guava in Malaysia, production, pests and diseases. Tropical Press SDN. BHD. Malaysia. 260p.
- Treutter D, Feucht W. 1991. Accumulation of Phenolic-Compounds above the Graft Union of Cherry Trees. Gartenbauwissenschaft. 56(3): 134-137.
- Treutter D. 2005. Significance of flavanoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. Plant biology. 7 (6): 581-591.
- Treutter D, Feucht W, Schmid PPS. 1986. Polyphenols of the Phloem in Relation to Incompatibility of Interspecific *Prunus* Graftings (*Prunus-Avium* L, *Prunus-Cerasus* L).1. Flavanones and Flavanols above the Graft Union. Gartenbauwissenschaft. 51(2): 77-84.

- Usenik V, Krska B, Vican M, Stampar F. 2006. Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca* L.) using phenol analyses. *Scientia Horticulturae*. 109(4): 332-338.
- Valencia OC. 1995. *Fundamentos de Fitoquímica*. Trillas. México, 235p.
- Wang Y, Kollmann R. 1996. Vascular differentiation in the graft union of in vitro-grafts with different compatibility. Structural and functional aspects. *Journal Plant Physiology*. 147, 521–533.
- Wasson, AP, Pellerone FI, Mathesius U. 2006. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *Plant Cell*. 18 (7): 1617-1629.
- Wilson PG, O'Brien MM, Gadek PA, Quinn CJ. 2001. Myrtaceae revisited: A Reassessment of infrafamilial groups. *American Journal of Botany*, 88 (11): 2013–2025.
- Yadava LU. 1996. Guava production in Georgia under cold-protection structure. pp. 451-457. In: J. Janick (ed.), *Progress in new crops*. ASHS Press, Arlington, VA.
- Yeoman MM, Kilpatrick DC, Miedzybrodzka MB, Gould AR. 1978. Cellular interactions during graft formation in plants, a recognition phenomenon *Symposia of the Society for Experimental Biology XXXII*. pp139-160.
- Yeoman MM. 1984. Cellular recognition systems in grafting. *Cellular interactions, Encyclopedia of Plant Physiology*, 453-472.
- Zarrouk O, Testillano PS, Risueno MC, Moreno MA, Gogorcena Y. 2010. Changes in cell/tissue organization and peroxidase activity as markers for early detection of graft incompatibility in peach/plum combinations. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 135, 9–17.
- Zeledon R, Wan FJ. 1994. *El cultivo de la guayaba Cañas Guanacaste, Costa Rica*.

## CAPÍTULO III

### DETECCIÓN TEMPRANA DE COMPATIBILIDAD I: *Psidium guajava*

#### INJERTADA SOBRE *P. friedrichsthalianum* PROPAGADAS *in vitro*

##### 3.1 RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo optimizar el enraizamiento *in vitro* del portainjerto Cass, además de una detección temprana de compatibilidad de 'Enana Roja Cubana' injertada sobre Cass mediante un estudio anatómico, análisis de azúcares solubles y fenoles totales. El enraizamiento se hizo mediante una etapa de inducción (24 horas), donde se evaluaron diferentes concentraciones de AIB 0.0 (T0), 3.42 (T1), 6.84 (T2), 10.27 (T3)  $\mu\text{mol}$ . La respuesta se determinó mediante la velocidad de enraizamiento, número y longitud de raíces, y un estudio anatómico. El mejor tratamiento fue T2, las primeras raíces emergieron 9 días después de iniciado los tratamientos, alcanzando 72% de enraizamiento a los 30 días. Se observó que el origen de la raíz adventicia en el tallo, es en el cambium vascular, mejorando el enraizamiento. Se hicieron dos tipos de injertos: aproximación y púa invertida. Después de seis meses se tomaron muestras de diferentes secciones del tallo por arriba y debajo y en el punto de unión de los injertos. Para el análisis anatómico, las variables evaluadas fueron: número de vasos, diámetro de vasos, número de radios, ancho de radio, grosor de corteza. Se hizo una cuantificación de azúcares solubles. La cuantificación de fenoles totales se determinó por medio de la reacción oxido-reducción de Folin-Ciocalteu. No se encontraron diferencias entre los tipos de injerto púa invertida y aproximación para ninguna de las variables anatómicas evaluadas, igualmente entre cada una de las secciones evaluadas, y de acuerdo con las fotografías se observó continuidad en los tejidos, desarrollo y diferenciación en el

cambium vascular. En cuanto a la cuantificación de azúcares solubles, no se observaron diferencias entre los tipos de injerto, sin embargo, hubo diferencias significativas en cada una de las secciones evaluadas, observando que la mayor concentración de azúcares se acumula en el punto de unión, siendo sacarosa el azúcar que en mayor cantidad se encontró. Para el análisis de fenoles totales, se encontraron diferencias entre los tipos de injertos, siendo el de aproximación el que mayor cantidad de fenoles acumula, en cuanto a las diferentes secciones, la mayor acumulación se observó por arriba y por debajo del punto de unión. Estos análisis indican la compatibilidad del injerto y la viabilidad de promover el uso de portainjertos en guayabo.

**Palabras clave:** anatomía, azúcares solubles, enraizamiento *in vitro*, fenoles totales, guayaba, portainjerto.

### 3.2 ABSTRACT

The objective of this study was optimize *in vitro* rooting of Cass rootstock and establishes a method for early detection of compatibility between the cultivar ‘Enana Roja Cubana’ grafted onto Cass. The rooting induction was 24 h with different concentrations ( $\mu\text{mol}$ ) of indole butyric acid (IBA): 0.0 (T0), 3.42 (T1), 6.84 (T2), 10.27 (T3). Response was determined with rate of rooting and number and length of roots, and the anatomical study. Two types of grafting were performed: approach and inverted thorn. After six months, tissue samples were taken at different sections of the stem (1 cm above, 1 cm below, and at the graft union) to quantify the concentration of soluble sugars, total phenol content and anatomical study. The results indicate that there was no significant difference ( $P = 0.05$ ) between the types of graft assessed in anatomical variables nor among the sections assessed. Continuousness was observed in the tissue, and there was adequate development and differentiation of the vascular cambium. There were no differences in content of soluble sugars between the types of grafting, but there were significant

differences among the evaluated sections. The highest concentration of sugars accumulated at the grafted point and the type of sugar found in the highest quantity was sucrose. Accumulation of phenols was higher in the approach graft above and below the point of union, and there were differences between the types of grafting. The study reveals anatomical and biochemical compatibility between the two species. It is feasible to promote the use of rootstock for guava.

**Key words:** anatomy, soluble sugars, *in vitro* rooting, total phenols, guava, rootstock.

### 3.3 INTRODUCCIÓN

El guayabo (*Psidium guajava* L.) se considera uno de los cultivos tropicales más importantes por su agradable sabor y valor alimenticio (Medina y Pagano 2003). En el cultivo de esta especie existen problemas serios como el ataque de nematodos. Varios autores señalan la importancia de los nematodos sobre el deterioro de árboles y reducción de la producción de guayaba. Avelar et al. (2001) encontraron asociación entre el grado de ataque de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* y la enfermedad denominada declinamiento, la cual reduce el tamaño de los árboles, del fruto y por lo tanto de la producción. Dificultades que podrían ser resueltas con el uso de patrones adecuados (Casassa et al. 1998). Sin embargo, en México no existen huertas comerciales que utilicen portainjertos. Existen genotipos dentro del género *Psidium* como Cass (*P. friedrichsthalianum*), que tienen la característica de ser tolerantes al ataque de los nematodos (Bocantes y Mora 2010).

Un patrón ideal para injertar es el que se adapta tanto al clima y al suelo, que es tolerante a patógenos e induce alta producción y calidad de fruta, que tiene un porte que facilita el manejo del cultivo (Monteverde 1989), y que además en el método de propagación se garantice la conservación de las características de la planta madre. Existen pocos trabajos relacionados con la propagación de especies que pudieran ser usados como portainjertos,

el cultivo *in vitro* es un método de propagación asexual para guayabo que asegura la regeneración de plantas completas y constituye en una alternativa de propagación que puede complementar satisfactoriamente con los métodos convencionales (Pontikis 1996). La elección del mejor portainjerto representa uno de los problemas más complejos de la fruticultura. Generalmente los injertos que se hacen, pertenecen a la misma especie o género, aunque el uso de genotipos genéticamente divergentes también es común (Errea et al. 2001). Existen diferentes factores involucrados en la compatibilidad o incompatibilidad del injerto por ejemplo: anatómicos, cuando la conexión vascular no se logra o existe incompatibilidad celular (Pina y Errea 2005), nuevas conexiones vasculares en el punto de unión del injerto sin diferenciación o con conexión débil, principal causa de incompatibilidad en plantas leñosas (Errea et al. 1994); factores fisiológicos, bioquímicos como la translocación de azúcares solubles (Ciobotari et al. 2010); y fitoquímicos relacionados con altas concentraciones de compuestos fenólicos acumulados cerca de la unión del injerto causando incompatibilidad (Errea 1998, Mng'omba et al. 2008).

Con base en lo anterior y tomando en cuenta que el estudio de la propagación de portainjertos es importante, se planteó como objetivo optimizar el enraizamiento *in vitro* del portainjerto Cass. Y por otra parte detectar oportunamente la compatibilidad/incompatibilidad de la Var. 'Enana Roja Cubana' de guayabo injertada sobre Cass mediante un estudio anatómico, análisis de azúcares solubles y de fenoles totales.

### **3.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.4.1 Material Vegetal**

Se utilizaron dos especies del género *Psidium*. Cass (*P. friedrichthalianum*), usado como portainjerto, a partir de árboles de aproximadamente 2 años de edad provenientes de semilla, obtenidos de un vivero del estado de Morelos. Además, la variedad 'Enana Roja

Cubana' (*P. guajava*) proveniente del Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila, Cuba.

### **3.4.2 Enraizamiento *in vitro***

Se multiplicaron *in vitro* brotes apicales del portainjerto Cass en un medio MS suplementado con sacarosa 30 g.L<sup>-1</sup>, mio-inositol 10 ml.L<sup>-1</sup>, tiamina 1 ml.L<sup>-1</sup> y bencilaminopurina (BAP) 1 ml.L<sup>-1</sup> (Concepción et al. 2005), los cuales fueron subcultivados cada 4 semanas.

Para el enraizamiento se utilizaron brotes de aproximadamente 1.5 cm de longitud colectados al final del periodo de multiplicación. Se evaluaron diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (AIB): 0.0 (T0), 3.42 (T1), 6.84 (T2), 10.27 (T3)  $\mu\text{mol}$ , en un medio MS al 50 % de su concentración, adicionado con sacarosa 30 g.L<sup>-1</sup>, tiamina 1 ml.L<sup>-1</sup>, mio-inositol 10 ml.L<sup>-1</sup>, después de 24 horas los brotes fueron cambiados a un medio similar sin auxinas. Para cada concentración se utilizaron frascos de vidrio de 250 mL con 50 mL de medio.

El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones y la unidad experimental estuvo conformada por seis brotes. Las variables evaluadas fueron: número de días en aparecer la primera raíz (cinética de enraizamiento), número de raíces totales, longitud de raíces y porcentaje de enraizamiento.

### **3.4.3 Estudio anatómico**

Para este estudio se tomaron muestras del mejor tratamiento de enraizamiento, que fue el T2, desde el día 0 hasta el día en que el que apareció la primer raíz. Las muestras se fijaron en FAA (Formalina-acido-alcohol) (10% de formaldehído al 37%, 50% de etanol, 5% de ácido acético glacial y 35% de agua) (Berlyn y Miksche 1976, Ruzin 1999). Se hicieron cortes longitudinales de 13  $\mu\text{m}$  con un micrómetro rotatorio (American Optical modelo 820), los cuales se tiñeron con verde fijo FCF y safranina "O" (Johansen 1940). Las

muestras fueron observadas y analizadas empleando un foto microscopio III Carl Zeiss con una cámara digital para microscopia PAXcam3.

#### **3.4.4 Injertación**

El material utilizado para injertar fue propagado *in vitro*, tanto el portainjerto como la variedad, y fueron aclimatados en un invernadero. Los injertos se hicieron en el invernadero una vez que las plantas del patrón y del injerto alcanzaron un diámetro de aproximadamente 1 cm. Se hicieron dos tipos de injertos: aproximación y púa invertida. Después de seis meses de injertar se hicieron los estudios anatómicos, bioquímicos y fitoquímicos. Se tomaron fragmentos de 0.5 cm de tallo, a 1 cm por arriba y por debajo del punto de unión de los injertos y fragmentos de 0.5 cm en el punto de unión de los injertos (Figura 3.1). Como testigo se eligieron árboles sin injertar, tanto del patrón como de la variedad en los que se tomaron muestras en las mismas posiciones como en los materiales injertados.

#### **3.4.5 Análisis anatómico**

Se colectaron fragmentos de tallo de aproximadamente 0.5 cm de longitud, de cada sección descrita en la figura 1, en cada tipo de injerto (púa invertida y aproximación), de tres árboles por cada tratamiento (injertos) y un árbol de cada uno de los testigos. Las muestras de tallo se colocaron en solución fijadora FAA (formaldehído, alcohol, acético), y se siguió la microtecnia descrita para estudio anatómico en cinética de enraizamiento, se hicieron cortes transversales entre 13 a 15  $\mu\text{m}$ . Las muestras fueron observadas y analizadas empleando un foto microscopio III Carl Zeiss con una cámara digital para microscopia PAXcam3. Las Variables evaluados fueron: número de vasos, diámetro de vasos (10 mediciones), número de radios, ancho de radio (tres mediciones), grosor de corteza (3 mediciones), se evaluaron tres arboles injertados, considerando a un árbol como una repetición.

### **3.4.6 Cuantificación de azúcares solubles totales**

Los azúcares solubles totales se determinaron por medio del método de Antrona (Montreuil et al. 1997). Por cada tipo de injerto se analizaron tres plantas y una planta por cada testigo, Se tomaron muestras de tres injertos de aproximación, tres injertos de púa invertida, y un árbol testigo Cass y un árbol testigo 'Enana Roja Cubana'. Por cada planta se colectaron de cada sección descrita en figura 3.1, cinco muestras de aproximadamente 0.5 cm cada una, para hacer un total de 15 muestras por planta. . Para los extractos de los tejidos se hicieron cuatro extracciones sucesivas con 3 mL de etanol al 80% en baño maría con temperatura de 80°C, los extractos obtenidos se colocaron a sequedad en una estufa a 60°C, se re-suspendieron en 1 mL de agua destilada. Para el ensayo se agregaron 3 mL de reactivo de antrona, adicionando 300 µL de extracto y 300 µL de agua destilada, la mezcla se colocó en hielo en un agitador orbital (Daigger®) constante a 180 rpm durante 5 minutos, para después transferir los tubos a baño maría por 10 minutos. Antes de la lectura los extractos se colocaron nuevamente en hielo por 5 minutos. Las lecturas de absorbancia a 625 nm se realizaron en un espectrofotómetro UV-visible (Evolution 300, Thermo). El contenido de azúcares se expresó en  $g \cdot 100g^{-1}$  de materia seca.

### **3.4.7 Glucosa, fructosa y sacarosa**

La cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa se realizó a partir de los extractos usados en la cuantificación de azúcares solubles totales, y se realizó enzimáticamente por la adición secuencial de hexocinasa, fosfoglucosa-isomerasa e invertasa de acuerdo al método de Scholes et al. (1994). Para los ensayos se colocaron 200 µL de amortiguador HEPES 100 mM (pH 7.5), 10 µL de NAD 40 mM, 10 µL de ATP 100 mM (pH 7), 10 µL de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y 10 µL de extracto. Para determinar glucosa se adicionaron 10 µL de hexocinasa (0.05 U por 1 µL de amortiguador HEPES) y se dejó actuar durante 20 minutos antes de hacer la lectura. La fructosa se determinó agregando

10  $\mu\text{L}$  de fosfoglucoasa isomerasa (0.06 U por 1  $\mu\text{L}$  de amortiguador HEPES) y a los 20 minutos se registró la lectura. Por último la determinación de sacarosa se hizo adicionando 10  $\mu\text{L}$  de invertasa (0.8 U por 1  $\mu\text{L}$  de amortiguador HEPES) y se dejó 20 minutos a temperatura ambiente antes de hacer la lectura. Las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro lector de microplacas (Varioskan Flash, Thermo Scientific) a una absorbancia de 340 nm. Los cálculos se realizaron mediante curvas estándares de calibración preparadas previamente para cada uno de los azúcares y se expresaron en  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de materia seca.

### **3.4.8 Determinación de Compuestos fenólicos totales**

La determinación se hizo por medio de la reacción oxido-reducción de Folin-Ciocalteu (Nielsen 1988). La colecta de las muestras se hizo de la misma forma que para el análisis de cuantificación de azúcares. Las muestras se molieron en mortero y se maceraron con 1.5 mL de etanol al 95 % por 24 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Después se centrifugaron a 16 060 g durante 10 minutos. Se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de extracto diluido, se le adicionó 450  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 250  $\mu\text{L}$  de reactivo Folín al 50%, y se dejó reposar durante 8 minutos, posteriormente se agregó 1.25 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 5%, se dejó reposar nuevamente por 30 minutos. Por cada extracto se realizaron dos replicas, la reacción se hizo en oscuridad. Las lecturas a una absorbancia de 725 nm se realizaron en un espectrofotómetro UV-Visible (Evolution 300, Thermo Scientific). Los resultados se expresaron en  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de materia seca.

### **3.4.9 Análisis estadístico**

Todos los resultados fueron sujetos a análisis de varianza (ANOVA) y para la separación de medias se utilizó la prueba de Tukey. Se usó el paquete estadístico Statistical Analysis System (SAS), versión 9.

## 3.5 RESULTADOS

### 3.5.1 Enraizamiento *in vitro*

El tiempo de enraizamiento del portainjerto Cass fue diferente para cada uno de los tratamientos (Figura 3.2). En el tratamiento T2 las primeras raíces emergieron a los 9 días después de iniciado los tratamientos, alcanzando un 72% de enraizamiento a los 30 días. Seguido por el tratamiento T0 en el cual las primeras raíces desarrollaron en el día 11, obteniendo en 44% de enraizamiento al final del periodo de evaluación. Mientras que para los tratamientos T1 y T3 las primeras raíces emergieron hasta los 13 días, alcanzando un 38% de enraizamiento. En cuanto al número y longitud de raíces no hubo diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 3.1), sin embargo, el T2 obtuvo el mayor número y longitud de raíces en comparación con el resto de los tratamientos, para la variable porcentaje de enraizamiento se obtuvieron diferencias altamente significativas, siendo el T2 el que mayor porcentaje tuvo, lo cual coincide con los resultados mostrados en la Figura 3.2.

En cuanto al análisis anatómico, en el día 0 antes de la aplicación de AIB (Figura 3.3A) la estructura anatómica en corte longitudinal mostró la corteza, la médula del tallo y el tejido vascular secundario con una estructura normal. Después de 24 horas de iniciado el tratamiento (Figura 3.3B) se observó que el parénquima cortical proliferó masivamente. Entre los tres y cinco días continuó la formación de callo tanto hacia la región de la epidermis como hacía el parénquima cortical (Figura 3.3C); este callo en la base del tallo, constituye un tejido cicatrizante (Figura 3.3C) que incluye todo el órgano (desde la médula hasta corteza secundaria). Esta proliferación callosa fue observada durante el día seis y siete. En el día 8 se observó la aparición de una raíz adventicia (Figura 3.3D), es preciso señalar que este proceso de rizogénesis no es uniforme ni continuo en todas las muestras, anatómicamente presentó todas sus estructuras: el cilindro vascular central

(xilema y floema secundarios), corteza de la raíz y rizodermis, conectada al tallo. En el noveno día (Figura 3.3E), en la región apical de el meristemo de la raíz, la cofia, su cilindro vascular central y la rizodermis. En la Figura 3.3F se observó que el origen de la raíz adventicia en el tallo, es en el cambium vascular, con conexión anatómica al xilema y al floema secundarios del tallo.

### **3.5.2 Estudio anatómico de compatibilidad de injertos**

No se encontraron diferencias significativas para las variables: número de vasos, diámetro de vasos y número de radios, para ninguno de los tipos de injertos usados, mientras que para el ancho de radio y el grosor del floema secundario se encontraron diferencias significativas, siendo el tipo de injerto púa invertida el que mayor ancho de radio y grosor de floema secundario presentó. La variable que más distingue a un tipo de injerto del otro fue el grosor de floema secundario seguido del ancho de radio (Cuadro 3.2).

No se obtuvieron diferencias significativas para ninguna de las variables anatómicas evaluadas (Cuadro 3.3), en las diferentes secciones en la interacción 'Enana roja cubana' sobre Cass.

En la Figura 3.4B se observa el punto de unión el cual está unido por la madera neoformada y se aprecia el desarrollo un nuevo cámbium vascular (CV). Resultados similares se obtuvieron para el injerto de aproximación (Figura 3.4D y F), en cuanto al punto de unión se observó el desarrollo de un anillo completo cámbium vascular, además de que se observaron las médulas de los tallos, lo cual es típico en un injerto de aproximación. (Figura 3.4E).

En la Figura 3.5, se muestra el grosor del floema secundario para cada uno de los tipos de injerto, púa invertida (Figura 5A y B), aproximación (Figura 5C y D) y los testigos

donde se observó que también el testigo 'Enana roja cubana' presentó el floema secundario es más abundante o desarrollado con respecto de los injertos y el testigo Cass.

### **3.5.3 Azúcares solubles totales (AST) y compuestos fenólicos totales (CFT)**

En el Cuadro 3.4 se muestra la comparación de medias para los tipos de injerto púa invertida y aproximación, para cada una de las variables evaluadas, no hubo diferencias estadísticamente significativas para AST, glucosa, fructosa y sacarosa, sin embargo, sacarosa es el azúcar que se encuentra en mayor cantidad para los dos tipos de injertos, mientras que para CFT se obtuvieron diferencias significativas, siendo el injerto de aproximación el que tuvo la concentración más alta.

En la comparación de medias para cada sección (Cuadro 5.5), en la interacción 'Enana roja cubana' injertada sobre Cass, hubo diferencias significativas para AST, donde la mayor acumulación se registró en el punto de unión. La sacarosa fue el azúcar que más se acumuló, y se detectó en mayor cantidad por debajo del punto de unión. La acumulación de CFT presenta diferencias significativas y es mayor por debajo y arriba del punto de unión. En el testigo sin injertar Cass (Cuadro 5.5) para AST se observaron diferencias altamente significativas, donde la mayor acumulación fue en la zona donde debería estar el punto de unión. Resultados similares se obtuvieron para glucosa, fructosa y sacarosa, siendo este último azúcar el que se acumula en mayor proporción. En los CFT no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, su distribución a través del tallo es muy similar, sin embargo, los valores van de menor a mayor, de la base a la parte superior del tallo. En el testigo sin injertar de 'Enana roja cubana', los AST mostraron diferencias, la mayor acumulación fue por arriba de donde debería estar el punto de unión. De los azúcares solo sacarosa tuvo diferencias significativas, y se concentró mayoritariamente arriba del punto de unión. El contenido de CFT no mostró diferencias significativas, el cual se encuentra uniformemente a través del tallo.

## 3.6 DISCUSIÓN

### 3.6.1 Cinética de enraizamiento *in vitro*

Un adecuado enraizamiento *in vitro* es fundamental para una mejor aclimatación *ex vitro* (Pati et al. 2006). El uso de auxinas para el enraizamiento *in vitro* de guayabo es común, Rodríguez et al. (2006) enraizaron brotes de guayabo de la variedad 'Cotorrera' agregando 0.98  $\mu\text{mol}$  de AIB y 1.14  $\mu\text{mol}$  de AIA  $\mu\text{mol}$  al medio de cultivo, comparado con nuestro trabajo, usamos mayor cantidad de AIB para estimular el enraizamiento de Cass (6.84  $\mu\text{mol}$ ). En cuanto a la velocidad de enraizamiento, la primera raíz emergió 9 días después de iniciado el tratamiento (T2), alcanzando 72 % de enraizamiento a los 30 días, resultados que no concuerdan con los obtenidos por Liu y Yang (2011), que lograron inducir el enraizamiento de guayabo cultivar Beaumont a los 12 días después del estímulo usando un medio al 50% MS, sin hormonas, obteniendo 65% de enraizamiento a los 30 días, cuando añadieron AIB al medio su porcentaje de enraizamiento disminuyó. En el T0, la primera raíz se registró a los 11 días de iniciado el experimento y se obtuvo un enraizamiento del 44%, esta respuesta puede estar relacionada con el balance hormonal endógeno de los brotes, favorable a las auxinas (Ali et al. 2003). El AIA (auxina natural) se sintetiza en las hojas jóvenes y ápices de crecimiento y se transporta basípetamente en el tallo mediante difusión polar quimiosmótica (transporte polar de auxinas) en tejidos asociados con el sistema vascular, especialmente por floema (Marks et al. 2002). En otros estudios realizados por Mishra et al. (2007) el desarrollo de raíces fue hasta los 17 días usando una concentración 49.2  $\mu\text{mol}$  de AIB y 30 días para una concentración de 123  $\mu\text{mol}$ , en el cultivar 'Allahabab Safeda'. Por lo que el tiempo de inducción también es importante, ya que altas concentraciones de auxinas en el medio de cultivo limitan el desarrollo de las mismas.

Ali et al. (2003) señalan que son diversos los factores que promueven el buen enraizamiento *in vitro* de guayabo, tales como: el origen de los explantes, el tipo y concentración de reguladores del crecimiento durante las fases de inducción, el crecimiento de brotes, la edad y el genotipo.

El estudio anatómico se realizó únicamente para el T2, debido a que el enraizamiento fue más rápido (9 días) y se obtuvo el mayor porcentaje de enraizamiento (72 %), sin embargo, no todos los explantes responden de la misma forma al tratamiento, ya que las características anatómicas son diferentes (Figura 3.3), y no presentan una secuencia, por lo que la formación de primordios radicales no es tan clara. Solo se observa proliferación del parénquima cortical y formación de callo, sin embargo, existen cambios en los tejidos que demuestran que los explantes responden al estímulo inicial con auxinas (AIB) (Figura 3F). Collet et al. (1994) trabajaron con brotes de fácil (88%) y difícil enraizamiento (33%) de diferentes cultivares de manzano, encontrando que la diferencias observadas en la respuesta al enraizamiento se deben a la capacidad para organizar rápidamente nuevas células en los primordios y no sólo a la capacidad para reactivar la división celular después de la herida al explante o a la respuesta del tratamiento auxínico, contrario a los resultados obtenidos por Vidal et al. (2003), quienes mostraron que fue necesario el uso de AIB para inducir enraizamiento en *Quercus robur*. Además, de que existe una conexión entre tallo y raíz, lo cual es importante dado que Cass es un portainjerto (Figura 3H), el origen de este enraizamiento adventicio ocurre en el cambium vascular. Ballester et al. (1999) reportan que para castaño enraizado *in vitro* (estímulo auxínico) el cambium vascular, el cual normalmente funciona como meristemo secundario, adquiere funciones de meristemo primario, formando el meristemo apical de la raíz.

### **3.6.2 Estudio de compatibilidad de injertos: anatómico, azúcares solubles totales (AST) y compuestos fenólicos totales (CFT)**

En este estudio se describe un método de detección temprana de compatibilidad basado en el análisis anatómico, concentración de azúcares solubles y compuestos fenólicos totales. Nuestros resultados confirman que existen diferencias visibles entre los tipos de injertos (púa invertida y aproximación). Canessa y Castro (2008) mencionan diferencias entre tipos de injertos para pistacho (astilla, yema en T, parche, hendidura apical y empalme lateral), evaluados en diferentes épocas de año, donde el tipo de injerto usado influyó en la compatibilidad. En contraste López et al. (2008), al utilizar en sandía dos métodos de injerto (púa y aproximación), señalan que el método de injertación no influye en la sobrevivencia de la planta. En cuanto a las diferentes secciones analizadas en este estudio, tanto para los injertos como para los testigos, no se encontraron diferencias en ninguna de las variables anatómicas evaluadas, lo que sugiere que hay compatibilidad entre los tejidos, además de que se observa desarrollo y diferenciación en el cambium vascular. El portainjerto y la vareta se unen de tal manera que las regiones del cambium vascular de ambas coinciden, una vez que esto ocurre hay una proliferación de células parenquimatosas, formando un callo. Las nuevas células se diferencian a partir del cambium del callo recién formado. Sin embargo, en el tejido donde se hizo el corte también comienza a diferenciar, primero el xilema seguido del floema. El último proceso para la formación del injerto ocurre con la formación de un nuevo xilema y floema, que permite la conexión vascular entre el portainjerto y la vareta. Esto es considerado como el requisito básico para un injerto exitoso (Yeoman 1984, Tiedemann 1989 Pina y Errea 2005). Según Akinnifesi et al. (2004) hacer coincidir las células del cambium vascular entre portainjerto y vareta es considerado un paso importante para el éxito del injerto.

Moore y Walker (1981) indican que la formación de callo es la primera respuesta del injerto, y se forma en injertos compatibles e incompatibles, a causa de la herida provocada, y su formación es independiente al desarrollo del injerto, lo que concuerda con nuestros resultados, la primera etapa de los injertos fue la formación de callo. Por su parte Wang y Kollmann (1996) consideran que la formación de conexiones vasculares es un requerimiento básico para un injerto exitoso, ya que está es la principal razón de incompatibilidad en plantas leñosas (Errea et al. 1994). El estudio sobre la regeneración del floema en los injertos ha sido tema de algunas investigaciones (Kollmann y Glockmann 1990, Golecki et al. 1998). En nuestro estudio no se detectaron diferencias entre las variables evaluadas respecto al floema, en las secciones por debajo y por arriba del punto de unión del injerto. Ermel et al. (1999), realizaron un análisis multivariado con datos histológicos, en pera injertado sobre membrillo considerando tres síntomas típicos de incompatibilidad del injerto: discontinuidad de corteza, acumulación de almidón en el punto de unión y disfunción del cambium vascular; el cual les permitió realizar un diagnóstico rápido de incompatibilidad.

En algunos casos injertos incompatibles pueden crecer durante varios años, sin indicación externa de incompatibilidad, y con formación de conexiones vasculares funcionales (Hartmann et al. 1997), dado que las causas de esta incompatibilidad pueden ser otras, como bioquímicas, fisiológicas o fitoquímicas. El uso de marcadores bioquímicos como los compuestos fenólicos y el almidón analizados por debajo, por encima y en el punto de unión, puede ser de utilidad para diagnosticar la incompatibilidad durante una etapa temprana de desarrollo del injerto (Darikova et al. 2011). En nuestro estudio, la concentración de azúcares solubles totales, glucosa, fructosa y sacarosa no tuvieron diferencias entre los tipos de injertos púa invertida y aproximación. Sin embargo, las diferencias de los injertos en cuanto al crecimiento fue distinto. Los injertos de púa fueron

plantas vigorosas, con abundantes hojas en el dosel, y tallos gruesos. Por lo que visualmente mostraron un mejor desarrollo, en relación con los injertos de aproximación, los cuales presentaban tallos más delgados y con menor cantidad de hojas. Al respecto se sabe que árboles con doseles más pequeños tienden a producir menos madera y menor cantidad de carbohidratos en comparación con los doseles más grandes (Canham et al. 1999)

La evaluación de compuestos en las diferentes secciones de los injertos mostro que la mayor concentración de azúcares solubles totales fue en el punto de unión, después por debajo del punto de unión y por último, por arriba del punto de unión (2.57, 2.23 y 1.87 g.100g<sup>-1</sup> respectivamente). En injertos de pera de diferentes cultivares se describen resultados similares en la tendencia de acumulación de azúcares solubles (punto de unión 0.052, debajo 0.041 y por arriba del punto de unión 0.032 g.100g<sup>-1</sup>) (Ciobotari et al. 2010), aunque las concentraciones de los azucars no pueden ser utilizados como un marcador para la compatibilidad entre vareta y patrón durante los primeros años, debido a que el contenido de los azúcares es una característica propia de cada cultivar. En injertos de cerezo evaluados en diferentes años, la mayor concentración de azúcares solubles se detectó en el punto de unión y por encima del punto de unión, lo cual podría ser una característica de distinción entre injertos compatibles e incompatibles, ya que una demanda menor de carbohidratos por el portainjerto, contribuye a niveles más altos por encima del punto de unión, y se refleja en el crecimiento vegetativo y reproductivo (Olmstead et al. 2010). En los testigos, los valores de azucars solubles son bajos. En el testigo Cass, la acumulación de azúcares ocurre justo a la mitad del tallo, a la altura donde debería estar el punto de unión. En el testigo 'Enana roja cubana', la acumulación y distribución de azúcares es de manera ascendente.

La sacarosa desempeña un papel importante como fuente de carbono y energía para los tejidos no fotosintéticos, además, se considera fundamental para el metabolismo de la planta (Park et al. 2009), siendo este azúcar metabolizado para formar glucosa y fructosa (Martinez-Barajas et al. 2003). Lo cual explica la alta concentración de este azúcar detectado en las secciones de los injertos, en relación a glucosa y fructosa.

En cuanto a la acumulación de compuestos fenólicos totales (CFT), hubo diferencias entre los distintos tipos de injerto, siendo el injerto de aproximación el que tuvo mayor cantidad. Esto se debe a que la herida que se hizo al momento de realizar el injerto es mayor, en comparación con el injerto de púa invertida, ya que es una reacción normal la formación de estos compuestos. En cuanto a la acumulación de CFT en las secciones del injerto, el punto de unión fue donde se detectó menor concentración. Lo que sugiere que los CFT no limitan la diferenciación del callo, como ocurre en *Prunus armenica*, en donde la acumulación de algunos compuestos fenólicos están relacionados con problemas en la diferenciación del callo y con la desorganización a nivel celular en el punto de unión (Errea et al. 1994). La presencia de compuestos fenólicos en el punto de unión se asocia generalmente con la incompatibilidad (Errea et al. 2001). Mng'omba et al. (2008) indican que en injertos de *Uapaca kirkiana* la incompatibilidad se atribuye a altas concentraciones de flavonoides y ácido cumárico acumulado en el punto de unión.

La mayor acumulación de CFT se observó por debajo y por arriba del punto de unión, lo cual podría limitar la diferenciación de las células (Errea 1998); al respecto Gebhardt y Feucht (1982) reportaron incompatibilidad por la acumulación de polifenoles por arriba del punto de unión. En otras especies se ha detectado acumulación de catequinas por encima de la unión del injerto, lo cual resulta en incompatibilidad (Usenik et al. 2006). Debido a que interfieren con la actividad de las peroxidases (Feucht 1998) y la actividad de la auxina AIA (Feucht y Treutter 1995), que están involucradas en procesos de

diferenciación vascular. Hudina et al. (2014) mencionan diferentes compuestos (catequina, la procianidina B1, la arbutina y varios flavonoles), como posibles causantes de incompatibilidad en pera injertado sobre membrillo. Dado que en nuestro estudio solo se hizo cuantificación de CFT, no es posible asegurar algún tipo de incompatibilidad por la presencia de estos compuestos. Sin embargo, Vargas et al. (2006) hicieron un análisis de flavonoides en guayabo, donde miricetina y quercetina son los únicos flavonoides presentes en la corteza. Además la acumulación de CFT también ocurre en respuesta de defensa de la planta, a diferentes tipos de estrés, a condiciones ambientales, al estado fisiológico del tejido, así como al manejo de los huertos (Dirr et al. 1994, Michalek et al. 1999).

La detección de incompatibilidad o compatibilidad de los injertos, es un proceso complejo motivo de estudios actuales, aunque ya se tienen especificados algunos factores como los defectos en la diferenciación del callo formado en el punto de unión, o interacciones metabólicas, y una formación de una zona necrótica en la unión del injerto. Es importante realizar más estudios que nos permitan una selección temprana de portainjertos, antes de que se observe algún síntoma de incompatibilidad externo.

En esta investigación se mejoró el enraizamiento *in vitro* del portainjerto mediante la inducción con AIB y un estudio anatómico que permitió verificar la conexión anatómica entre tallo y raíz. Además se incluyeron diferentes análisis que dan un panorama de la compatibilidad temprana del injerto 'Enana roja cubana' sobre Cass, se concluye que de acuerdo a la anatomía de las secciones de los injertos, asociado con la distribución y concentración de azúcares solubles y compuestos fenólicos totales existe compatibilidad. Aunque es necesario hacer un estudio más detallado sobre el tipo y contenido de fenoles, que en futuro puedan afectar al injerto.

### 3.7 LITERATURA CITADA

- Akinnifesi FK, Chilanga T, Mkonda A, Kwesiga F (2004) Domestication of *Uapaca kirkiana* in southern Africa: A preliminary evaluation of provenances in Malawi and Zambia. In: Rao MR, Kwesiga FR (eds) Proceedings of the Regional Agroforestry Conference on Agroforestry Impacts on Livelihood in Southern Africa: Putting research into practice. World Agroforestry Ctr., Nairobi, Kenya, pp 85–92.
- Ali B N, Mulwa RMS, Norton M A, Skinvin RM (2003) Micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.) J. Hort Sci Biotech 78 (5):739-741.
- Avelar M J, Téliz O D, Zavaleta M E (2001) Patógenos asociados con el “declinamiento del guayabo”. Revista mexicana de Fitopatología 19(2): 223-229.
- Ballester A, San-Jose MC, Vidal N, Fernández-Lorenzo JL, Vieitez AM (1999) Anatomical and biochemical events during *in vitro* rooting of microcuttings from juvenile and mature phases of chestnut. Ann Bot 83: 619-629.
- Berlyn GP, Miksche JP (1976) Botanical microtechnique and cytochemistry. Iowa State, University Press. Ames. U.S.A.
- Bocantes AA, Mora NE (2010) Evaluación de cuatro patrones para injertos de guayaba (*Psidium guajava* L.). Agron Mesoam 21(1): 103-111.
- Canessa FD, Castro V M (2008) Evaluación de diferentes tipos de injertos en pistacho (*Pistacia vera* L.), utilizando las variedades Peters, Kerman y Aegina sobre *pistacia terebinthus* en tres épocas del año. Simiente 78: 1-8.
- Canham CD, Kobe RK, Latty EF, Chazdon RL (1999) Interspecific and intraspecific variation in tree seedling survival, effects of allocation to roots versus carbohydrate reserves. Oecologia (Heidelb) 121:1–11.

- Cassassa A, Crozzolli R, Matheus J, Bravo V, Marin M (1998) Efecto del nematodo agallador (*Meloidogyne incognita*) sobre el crecimiento del guayabo (*Psidium spp.*) en vivero. *Nematol Medit* 26:237-242.
- Ciobotari G, Brianza M, Morariu A, Gradinariu G (2010) Graft incompatibility influence on assimilating pigments and soluble sugars amount of some pear (*Pyrus sativa*) Cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanic Cluj* 38(1):187-192.
- Collet GF, Nowbuth L, Le CL (1994) Comparison of the easy-to-root. Jork 9 and Cepiland and the difficult-to-root EMLA 9 and Lancep *Malus* M9 rootstocks *in vitro*. *Ad.ances in J Hortic Sci* 8: 45-48.
- Concepción LO, Nápoles BL, Pérez MA, Hernández M, Peralta N, Trujillo SR (2005) Efecto de tres antioxidantes en el cultivo *in vitro* de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.). Relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. *Cultivos Tropicales* 26:33-39.
- Darikova JA, Savva YV, Vaganov EA, Grachev AM, Kuznetsova GV (2011) Grafts of woody plants and the problem of incompatibility between scion and rootstock. *Journal of Siberian Federal University. Biology* 1(4): 54-63.
- Dirr U, Feucht W, Treutter D (1994) Effect of nutrient deficiency on accumulation and leakage of the stress metabolite prunin. *Acta Hort* 381: 398–404.
- Ermel FF, Kervella J, Catesson AM, Poëssel JL (1999) Localized graft incompatibility in pear/quince (*Pyrus communis/Cydonia oblonga*) combinations: multivariate analysis of histological data from 5-month-old grafts. *Tree Physiol* 19: 645-654.
- Errea P (1998) Implications of phenolic compounds in graft incompatibility in fruit tree species. *Sci Hort* 74:195-205.
- Errea P, Felipe A, Herrero M (1994) Graft establishment between compatible and incompatible *Prunus* spp. *J. Exp Bot* 45, 393–401.
- Errea P, Garay L, Marin JA (2001) Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*) using *in vitro* techniques. *Physiol Plant* 112:135–141.

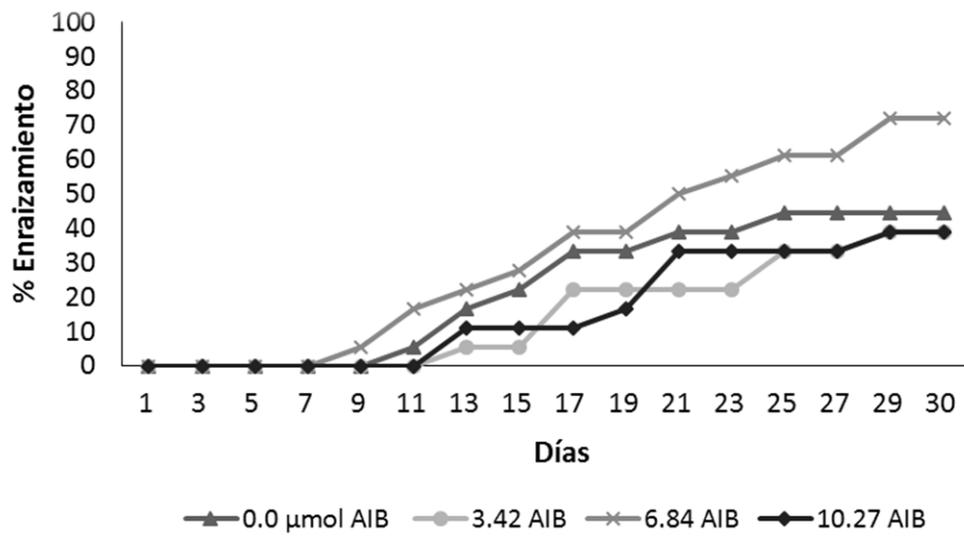
- Feucht W, Treutter D (1995) Catechin effects on growth related processes in cultivated calli of *Prunus avium*. *Gartenbauwissenschaft* 60 (1): 7–11.
- Feucht W (1988) Graft incompatibility of tree crops: an overview of the present scientific status. *Acta Hort* 227: 33–41.
- Gebhardt K, Feucht W (1982) Polyphenol changes at the union of *Prunus avium*/*Prunus cerasus* grafts. *J Horticult Sci* 57: 253–258.
- Golecki B, Schulz A, Carstens-Behrens U, Kollmann R (1998) Evidence for graft transmission of structural phloem proteins or their precursors in heterografts of *Cucurbitaceae*. *Planta* 206: 630–640.
- Hartmann HT, Kester DE, Davies FT, Geneve RL (1997) *Plant Propagation. Principles and Practices*, sixth ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Hudina M, Orazem P, Jakopic J, Stampar F (2014) The phenolic content and its involvement in the graft incompatibility process of various pear rootstocks (*Pyrus communis* L.). *J Plant Physiol* 171: 76– 84.
- Kollmann R, Glockmann C (1990) Sieve elements of graft unions. In: Behnke HD, Sjolund RD (Eds.) *The Sieve Element—Comparative Structure, Induction, Development*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 219–237.
- Liu X, Yang G (2011) Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L) on nodal explants of mature elite cultivar. *Int J Plant Biol* 2(2): 7-11.
- López EJ, Romo AA, Domínguez SJ (2008) Evaluación de métodos de injerto en sandía (*Citrullus lanatus* (thunb.) Matsum. & nakai) sobre diferentes patrones de calabaza. *IDESIA* 2: 13-18.
- Marks TR, Ford YY, Cameron RWF, Goodwin C, Myres PE, Judd HL (2002) A role for polar auxin transport in rhizogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 70:189-198.

- Martínez-Barajas F (2003) Análisis de la acumulación de azúcares en pericarpios de dos genotipos silvestres de jitomate (*Lycopersicon esculentum*). *Agrociencia* 37:363-370.
- Medina ML, Pagano F (2003) Caracterización de la pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) tipo “Criolla Roja”. *Rev Fac Agron (LUZ)* 20: 72-86.
- Michalek S, Mayr U, Treutter D, Lux-Endrich A, Gutmann M, Feucht W, Geibel M (1999) Role of flavan-3-ols in resistance of apple trees to *Venturia inaequalis*. *Acta Hort* 484: 535–539.
- Mishra DS, Tiwari JP, Shant L (2007) *In vitro* cloning of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Pant Prabhat. *Acta Hort* 735: 127-132.
- Mng’omba S, du Toit E, Akinnfesi F (2008) The relationship between graft incompatibility and phenols in *Uapaca kirkiana* Müell Arg. *Sci Hort* 117: 212-218.
- Monteverde E (1989) Evaluación del naranjo “Valencia” sobre diez patrones en los valles altos de Carabobo - Yaracuy. Calidad del fruto y recomendaciones. Maracay Venezuela. FONAIAP Divulgación N°32 Julio-Diciembre. 5 p.
- Montreuil J, Spik G, Fournet B, Toillier T (1997) Nonenzymatic determinations of carbohydrates. In: Multon L (Ed) *Analysis of Food Constituents*. Wiley-VCH. USA.
- Moore R, Walker DB (1981) Studies on vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. I. A structural study of a compatible autograph in *Sedum telephoides* (Crassulaceae) *Am J Bot* 68: 820–830.
- Olmstead MA, Lang SN, Lang GA (2010) Carbohydrate profiles in the graft union of young sweet cherry trees grown on dwarfing and vigorous rootstocks. *Sci Hort* 124:78–82.
- Park JY, Canam T, Kang KY, Unda F, Mansfield S (2009) Sucrose phosphate synthase expression influences poplar phenology. *Tree Physiol* 29:937-946.

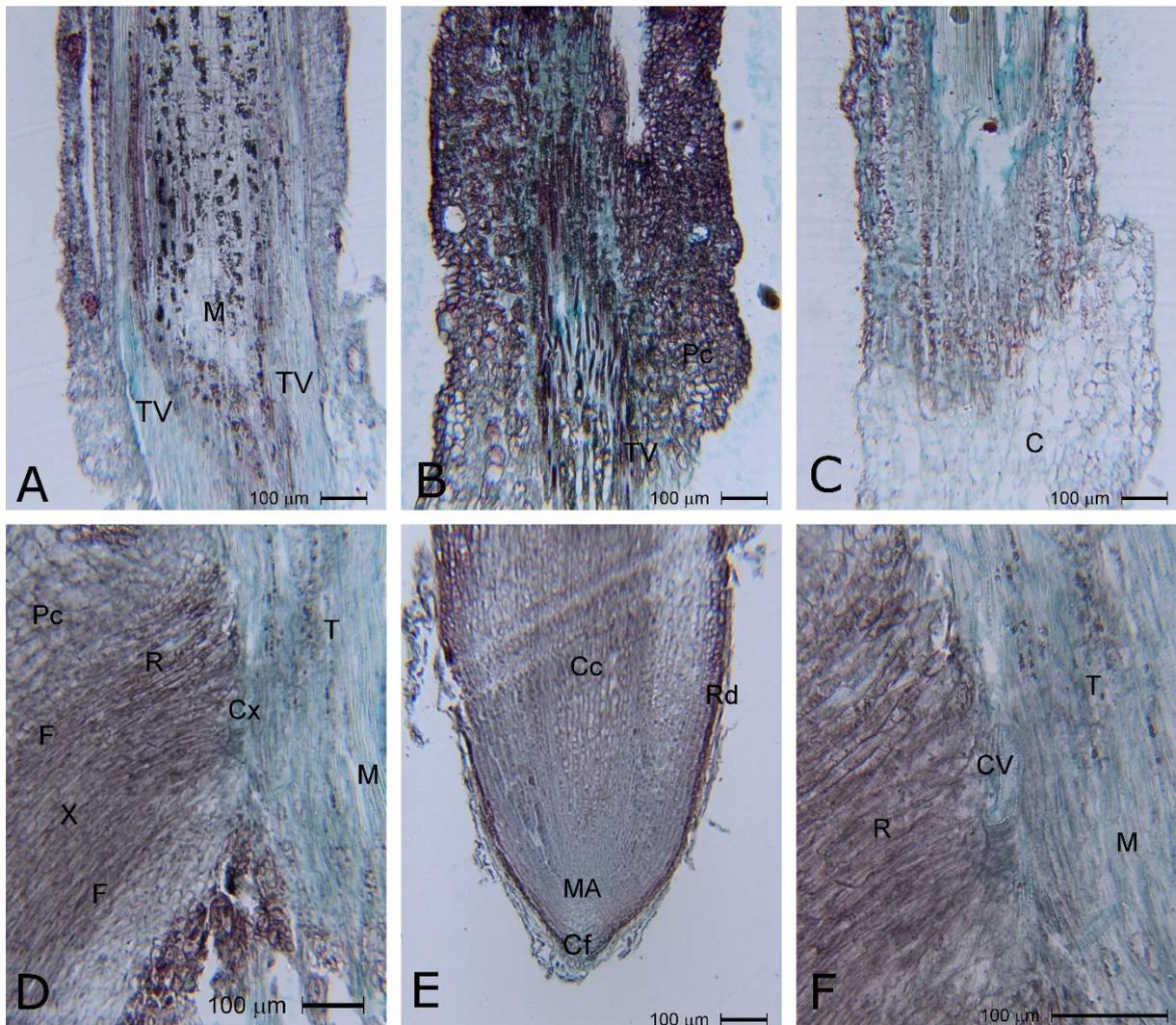
- Pati PK, Rath SP, Sharma M, Sood A, Ahuja PS (2006) *In vitro* propagation of rose—a review. *Biotechnol Adv* 24: 94-114.
- Pina A, Errea P (2005) A review of new advances in mechanism of graft compatibility-incompatibility. *Sci Hort.* 106:1-11.
- Pontikis CA (1996) *Psidium guajava* L. In: Bajaj, Y. P. S. (ed). *Biotechnology in Agriculture and Forestry.* *Trees* 35 (6) 308-320.
- Rodríguez NN, Velázquez B, Cabrera I (2006) Multiplicación *in vitro* de *Psidium guajava* L. ‘Cotorrera’ a partir de explantes nodales. *Revista CITRIFRUT* 23(2):45-52.
- Ruzin SE (1999) *Plant Microtechnique and Microscopy.* Oxford University Press, New. U.S.A.
- Scholes JD, Lee PJ, Horton P, Lewis DH (1994) Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytol* 126: 213-222.
- Tiedemann R (1989) Graft union development and symplastic phloem contact in the heterograft *Cucumis sativus* on *Curcubita ficifolia*. *J Plant Physiol* 134: 427–440.
- Usenik V, Krs`ka B, Vic`an M, S`tampar F (2006) Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca* L.) using phenol analyses. *Sci Hort* 109: 332–338.
- Vargas AD, Soto HM, González HV, Engleman ME, Martínez GA (2006) Cinética de acumulación y distribución de flavonoides en guayaba (*Psidium guajava* L.) *Agrociencia* 40: 109-115.
- Vidal N, Arellano G, San-José MC, Vieitez AM, Ballester A (2003) Developmental stages during the rooting of in-vitro-cultured *Quercus robur* shoots from material of juvenile and mature origin. *Tree Physiol* 23, 1247–1254.
- Yeoman MM (1984). Cellular recognition systems in grafting. In: Linkskens HF, Heslop-Harrison I (Eds) *Cellular Interaction, Encyclopaedia of Plant Physiology, New Series*, vol. 17. Springer-Verlag, Berlin, pp. 453–472.



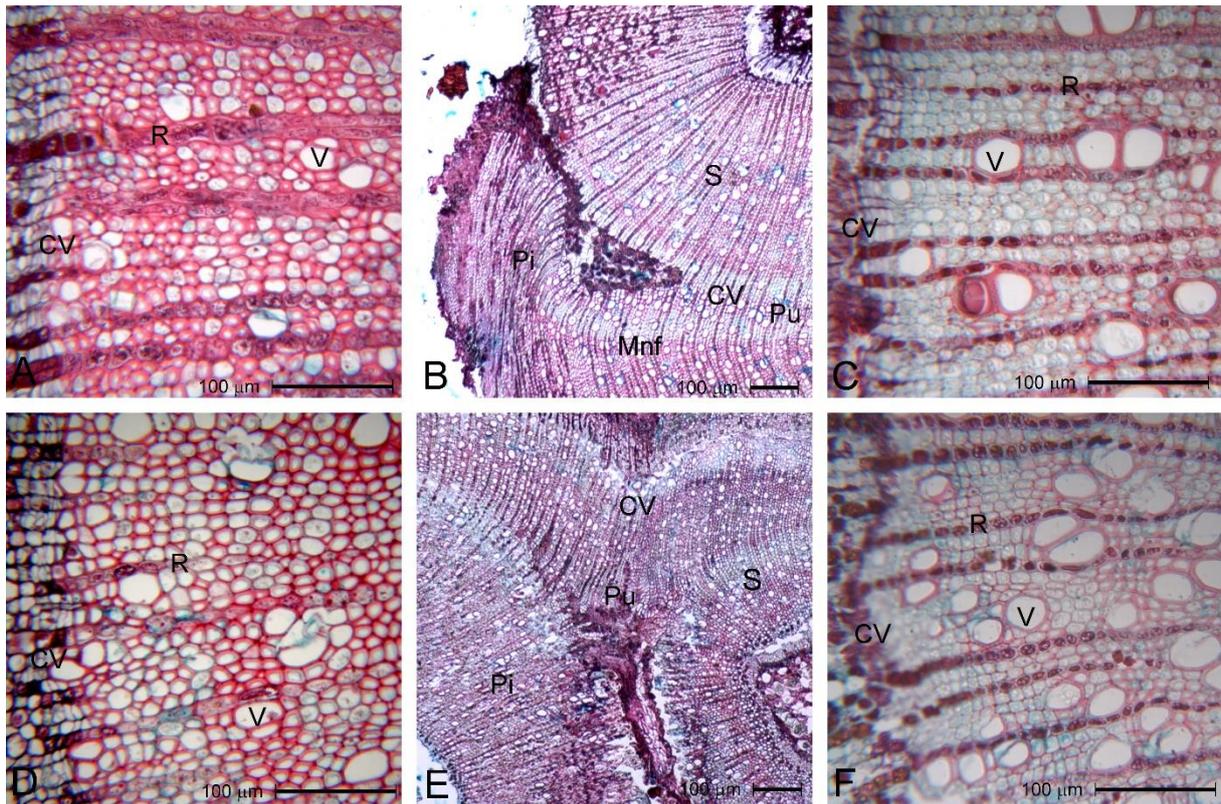
**Figura 3.1** Esquema de las zonas de toma de muestra en los injertos. La imagen representa el injerto de aproximación 'Enana roja cubana' injertada sobre Cass.



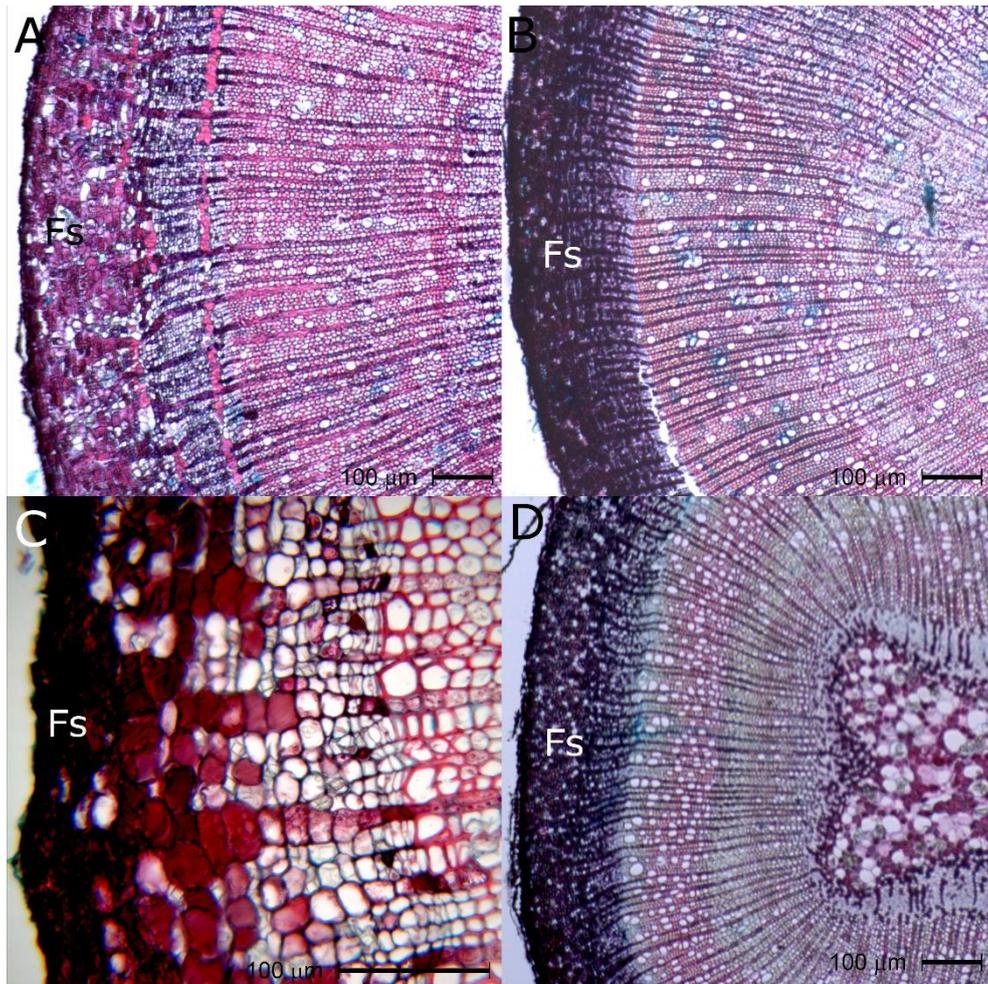
**Figura 3.2** Efecto de la concentración de AIB sobre en el enraizamiento in vitro del portainjerto Cass, 30 días después del inicio de los tratamientos.



**Figura 3.3** Secciones longitudinales de la base de tallo del portainjerto Cass, tomadas de 0-9 días para el tratamiento 6.84  $\mu\text{mol}$  de AIB (T2) durante la inducción del enraizamiento. (A) Estructura anatómica de tallo al momento de la inducción (Día 0). (B) Base del tallo a las 24 horas después de iniciado los tratamientos, proliferación del parénquima cortical (Pc). (C) Formación de callo (c) en epidermis, parénquima cortical, y tejido vascular en la base de los tallos durante el día 3 después de la inducción de enraizamiento. (D) Formación de la raíz adventicia (R) 8 días después de inicio de los tratamientos. (E y F) Raíz a los 9 días después de la inducción. (E) Ápice de raíz adventicia. (F) Origen de raíz adventicia en el tallo, conexión tallo-raíz hacia la región del cambium vascular. Abreviaciones: M = médula, TV= tejido vascular del tallo, PC= parénquima cortical, c= callo, R= raíz adventicia, X= xilema, F= floema, MA= meristemo apical de la raíz, T= tallo, CV= cámbium vascular, Rd= Rizodermis, Cx= Conexión de la raíz adventicia con el tallo, Cf= Caliptra o cofia, Cc= Cilindro vascular central.



**Figura 3.4** Cortes transversales mostrando la madera (xilema secundario) del Injerto Púa invertida (A) debajo del punto de unión, (B) punto de unión, (C) arriba del punto de unión. Injerto Aproximación (D) debajo del punto de unión, (E) punto d unión, (F) arriba del punto de unión. CV= Cámbium vascular, V= elementos de vaso, R= radios. Pu= Punto de unión, Mnf= Madera neoformada, Pi= Portainjerto, S=Vareta.



**Figura 3.5** Cortes transversales de la madera y corteza de tipos de injerto. Grosor de floema secundario (Fs). Injerto Púa invertida (A) debajo del punto de unión, (B) Arriba del punto de unión. Injerto Aproximación (C) debajo del punto de unión, (D) Arriba del punto de unión.

**Cuadro 3.1** Comparación de medias de las diferentes concentraciones de AIB, para las variables número y longitud de raíces y porcentaje de enraizamiento en el portainjerto Cass (*P. friedrichsthalianum*).

Tratamiento	Número de raíces	Longitud de Raíces (cm)	Porcentaje de enraizamiento (%)
<b>T0</b>	1.258 a	1.336 a	44 b
<b>T1</b>	1.253 a	1.293 a	38 d
<b>T2</b>	1.382 a	1.471 a	72 a
<b>T3</b>	1.241 a	1.291 a	38 c
<b>DMS</b>	0.164	0.228	0.143

Valores con la misma letra dentro de la misma columna no presenta diferencias significativas (Tukey  $\alpha=0.05$ ); DMS= Diferencia Mínima Significativa.

**Cuadro 3.2** Comparación de medias de las características anatómicas de la madera y del floema secundario en el estudio de compatibilidad de guayabo: 'Enana roja cubana' injertada sobre Cass.

Tipo de Injerto	Número de vasos	Diámetro de vasos ( $\mu\text{m}$ )	Número de radios	Ancho de radio ( $\mu\text{m}$ )	Grosor de floema secundario ( $\mu\text{m}$ )
<b>Púa Invertida</b>	14.33 a	18.72 a	1.833 a	14.987 a	383.29 a
<b>Aproximación</b>	15.33 a	18.27 a	2.00 a	11.64 b	246.79 b
<b>DMS</b>	4.14	3.39	0.721	2.44	40.40

Valores con la misma letra dentro de la misma columna no presenta diferencias significativas (Tukey  $\alpha=0.05$ ); DMS= Diferencia Mínima Significativa.

**Cuadro 3.3** Comparaciones de medias para las variables anatómicas observadas en cortes transversales en madera de guayabo en las diferentes secciones para ‘Enana roja cubana’ injertada sobre Cass, y de los testigos.

	Sección	Número de vasos	Diámetro de vasos (µm)	Número de radios	Ancho de radio (µm)	Grosor de floema secundario (µm)
<b>‘Enana roja cubana’/Cass</b>	Debajo del punto de unión	15.83 a	17.86 a	1.83 a	14.72 a	311.86 a
	Arriba del punto de unión	13.83 a	19.11 a	2.00 a	11.90 a	319.22 a
	DMS	4.14	3.39	0.72	2.44	40.40
<b>Testigo Cass</b>	Debajo del punto de unión	13.33 a	24.92 a	1.66 a	20.14 a	356.38 a
	Arriba del punto de unión	14.00 a	24.63 a	1.66 a	20.14 a	356.38 a
	DMS	3.92	6.71	3.92	2.26	37.14
<b>Testigo ‘Enana roja cubana’</b>	Debajo del punto de unión	13.00 a	13.33 a	2.33 a	15.36 a	547.10 a
	Arriba del punto de unión	14.66 a	14.06 a	1.66 a	15.36 a	547.10a
	Media	2.44	6.88	1.30	0.56	3.01
	DMS	3.56	3.67	3.95	2.79	39.45

Valores con la misma letra dentro de la misma columna no presenta diferencias significativas (Tukey  $\alpha= 0.05$ ); DMS= Diferencia Mínima Significativa.

**Cuadro 3.4** Comparaciones de medias de las variables concentración de azúcares y compuestos fenólicos totales en los dos tipos de injerto de ‘Enana roja cubana’ injertada sobre Cass.

Tipo de Injerto	Azúcares	Glucosa (g·100g <sup>-1</sup> )	Fructosa (g·100g <sup>-1</sup> )	Sacarosa (g·100g <sup>-1</sup> )	Fenoles
	solubles totales (g·100g <sup>-1</sup> )				Totales (g·100g <sup>-1</sup> )
<b>Púa Invertida</b>	2.35 a	0.02 a	0.19 a	0.43 a	0.71 b
<b>Aproximación</b>	2.09 a	0.02 a	0.19 a	0.47 a	0.91 a
<b>DMS</b>	0.25	0.003	0.02	2.82	0.06

Valores con la misma letra dentro de la misma columna no presenta diferencias significativas (Tukey  $\alpha=0.05$ ); DMS= Diferencia Mínima Significativa.

**Cuadro 3.5** Comparaciones de medias de las variables concentración de azúcares solubles totales, glucosa, fructosa, sacarosa y compuesto fenólicos totales (CFT) en ‘Enana roja cubana’ injertada sobre Cass, y los testigos, medidos arriba, debajo y en el punto de unión.

	Sección	Azúcares solubles				CFT (g·100g <sup>-1</sup> )
		totales (g·100g <sup>-1</sup> )	Glucosa (g·100g <sup>-1</sup> )	Fructosa (g·100g <sup>-1</sup> )	Sacarosa (g·100g <sup>-1</sup> )	
<b>‘Enana roja cubana’/Cass</b>	Debajo del punto de unión	2.23 ab	0.039 a	0.24 a	0.51 a	0.81 a
	Punto de unión	2.57 a	0.020 c	0.14 c	0.45 ab	0.71 b
	Arriba del punto de unión	1.87 b	0.026 b	0.19 b	0.39 b	0.90 a
	DMS	0.37	0.005	0.037	0.088	0.09
	Debajo del punto de unión	2.66 b	0.014 b	0.128 b	0.228 b	2.05 a
<b>Testigo Cass</b>	Punto de unión	7.13 a	0.114 a	0.241 a	1.20 a	2.23 a
	Arriba del punto de unión	2.16 b	0.013 b	0.113 b	0.24 b	2.27 a
	DMS	0.58	0.02	0.01	0.26	0.55
	Debajo del punto de unión	2.47 b	0.01 a	0.07 a	0.24 b	1.07 a
<b>Testigo ‘Enana roja cubana’</b>	Punto de unión	2.58 b	0.01 a	0.08 a	0.25 ab	1.13 a
	Arriba del punto de unión	3.13 a	0.01 a	0.08 a	0.31 a	1.23 a
	Media	2.73	0.01	0.08	0.27	1.14
	DMS	0.29	0.002	0.01	0.06	0.26
	Debajo del punto de unión	2.47 b	0.01 a	0.07 a	0.24 b	1.07 a

Valores con la misma letra dentro de la misma columna no presenta diferencias significativas (Tukey  $\alpha=0.05$ ); DMS= Diferencia Mínima Significativa

## CAPITULO IV

### **DETECCIÓN TEMPRANA DE COMPATIBILIDAD II: GUAYABA ´Enana Roja Cubana´ INJERTADA SOBRE GUAYABA NAYARIT PROPAGADAS *in vitro***

#### **4.1 RESUMEN**

El objetivo de esta investigación fue optimizar el enraizamiento *in vitro* del portainjerto guayaba Nayarit, además de una detección temprana de compatibilidad de ´Enana Roja Cubana´ injertada sobre Nayarit mediante un estudio anatómico, análisis de azúcares solubles y fenoles totales. El enraizamiento *in vitro* se realizó mediante una etapa de inducción (24 horas), donde se evaluaron diferentes concentraciones de AIB 0.0 (T0), 3.42 (T1), 6.84 (T2), 10.27 (T3)  $\mu\text{mol}$ . La respuesta se evaluó mediante la velocidad de enraizamiento, número y longitud de raíces, y un estudio anatómico. El mejor tratamiento fue T2, las primeras raíces emergieron 8 días después de iniciado los tratamientos, alcanzando 100% de enraizamiento a los 22 días. Se observó el origen de la raíz adventicia en el tallo, y existe una conexión entre tallo y raíz. Se hicieron dos tipos de injertos: aproximación y púa invertida. Después de seis meses se tomaron muestras de diferentes secciones del tallo por arriba y debajo y en el punto de unión de los injertos. Para el análisis anatómico, las variables evaluadas fueron: número de vasos, diámetro de vasos, número de radios, ancho de radio, grosor de corteza. Se hizo una cuantificación de azúcares solubles y de fenoles. No se encontraron diferencias entre los tipos de injerto púa invertida y aproximación para ninguna de las variables anatómicas evaluadas, igualmente entre cada una de las secciones evaluadas, y de acuerdo con las fotografías se observó continuidad en los tejidos, desarrollo y diferenciación en el cambium

vascular. En cuanto a la cuantificación de azúcares solubles, se observaron diferencias entre los tipos de injerto en cada de las variables evaluadas, siendo el de aproximación donde hubo mayor concentración de azúcares y fenoles totales. Se encontraron diferencias significativas en cada una de las secciones evaluadas, observando que la mayor concentración de azúcares y fenoles totales se acumula en el punto de unión, la sacarosa fue el azúcar que se encontró en mayor cantidad. Estos análisis indican la compatibilidad del injerto y la viabilidad de promover el uso de portainjertos en guayabo.

## **4.2 INTRODUCCIÓN**

El injerto es un método ampliamente utilizado para la propagación de plantas. Los injertos pueden pertenecer a la misma especie o género, sin embargo, el uso de genotipos genéticamente divergentes también es común (Errea et al. 2001). En estos casos el injerto no siempre es exitoso, lo cual es considerado como una incompatibilidad. La incompatibilidad de los injertos puede estar asociada a síntomas relacionados con el envejecimiento foliar y alteraciones en el sistema radicular (Errea 1998), y a una degeneración de los tubos cribosos y células acompañante del floema. Esto provoca problemas en la translocación de algunos compuestos que se acumulan por encima del punto de unión. La incompatibilidad anatómica también está relacionada con malformaciones en la unión del injerto, los cuales son débiles, y pueden sufrir una ruptura. En este tipo de incompatibilidad, existen trastornos en la funcionalidad del nuevo cambium vascular y fallas en la diferenciación de nuevos tejidos y continuidad vascular. Esta manifestación de incompatibilidad del injerto puede ocurrir años después, lo que dificulta la selección de portainjertos (Errea 1998), por lo que se requieren estudios de detección temprana de compatibilidad o incompatibilidad.

La guayaba es una de las frutas tropicales y subtropicales más importantes, por su excelente sabor y aroma, elevada digestibilidad, rica en vitamina A, B y C, fibra, proteínas y minerales (Fioravanço et al. 1995). En guayabo existen problemas importantes con el ataque de nematodos, ya que pueden acabar con plantaciones completas (Avelar et al. 2001), y problemas de fertilidad en los suelos (Manica 2000), por lo que se requiere de portainjertos que solucionen todos o algunos de estos problemas. Como es el caso del genotipo de guayabo (*P. guajava*) selección Nayarit que es resistente a deficiencias nutrimentales, principalmente zinc (Domínguez et al. 2010).

Con base en lo anterior y tomando en cuenta que el estudio de la propagación de portainjertos es importante, se planteó como objetivo optimizar el enraizamiento *in vitro* del portainjerto Nayarit. Y por otra parte detectar oportunamente la compatibilidad/ incompatibilidad de la Var. 'Enana Roja Cubana' de guayabo injertada sobre Nayarit mediante un estudio anatómico, análisis de azúcares solubles y de fenoles totales.

### **4.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **4.3.1 Material Vegetal**

Se utilizaron dos genotipos de guayabo la selección Nayarit (*Psidium guajava*), usado como portainjerto, a partir de árboles de aproximadamente 2 años de edad provenientes de semilla. Además, la variedad 'Enana Roja Cubana' (*P. guajava*) originaria del Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila, Cuba.

#### **4.3.2 Enraizamiento *in vitro***

Se propagaron *in vitro* brotes apicales del portainjerto Nayarit de acuerdo con lo descrito por Concepción et al. (2005), subcultivados cada 4 semanas.

Para la etapa de enraizamiento *in vitro* se utilizaron brotes de aproximadamente 1.5 cm de longitud. Se evaluaron diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (AIB): 0.0 (T0), 3.42 (T1), 6.84 (T2), 10.27 (T3)  $\mu\text{mol}$ , en un medio *Murashige y Skoog* (MS) al 50 % de su concentración, adicionado con sacarosa 30  $\text{g.L}^{-1}$ , tiamina 1  $\text{ml.L}^{-1}$ , mio-inositol 10  $\text{ml.L}^{-1}$ , después de 24 horas los brotes fueron cambiados a un medio similar sin auxinas. Los cuales se desarrollaron en un cuarto de incubación, bajo un ambiente de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad (luz artificial), y temperatura que osciló entre  $25 \pm 2$  °C.

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con tres repeticiones y la unidad experimental estuvo conformada por seis brotes. Las variables evaluadas fueron: número de días en aparecer la primera raíz (cinética de enraizamiento), número de raíces totales, longitud de raíces y porcentaje de enraizamiento.

#### **4.3.3 Estudio anatómico**

Para este estudio se tomaron muestras del mejor tratamiento de enraizamiento, que fue el T2, desde el día 0 hasta el día en que el que apareció la primer raíz. Las muestras se fijaron en FAA (Formalina-acido-alcohol) (10% de formaldehído al 37%, 50% de etanol, 5% de ácido acético glacial y 35% de agua) usando la metodología reportada por Berlyn y Miksche (1976) y Ruzin (1999). Se hicieron cortes longitudinales de 13  $\mu\text{m}$  con un micrómetro rotatorio (American Optical modelo 820), se tiñeron con verde fijo FCF y safranina “O” (Johansen 1940). Las muestras fueron observadas y analizadas empleando un foto microscopio III Carl Zeiss con una cámara digital para microscopia PAXcam3.

#### **4.3.4 Injertación**

El material vegetal utilizado para injertar fue propagado *in vitro* y se aclimataron en un invernadero. Los injertos se hicieron una vez que las plantas del portainjeto y del injerto alcanzaron un diámetro de aproximadamente 1 cm. Se hicieron dos tipos de injertos:

aproximación y púa invertida. Seis meses después de injertar se hicieron los estudios anatómicos, la cuantificación de azúcares solubles y la determinación de compuestos fenólicos totales. Se tomaron fragmentos de 0.5 cm de tallo, a 1 cm por arriba y por debajo del punto de unión de los injertos y fragmentos de 0.5 cm en el punto de unión de los injertos. Como testigo se usaron árboles sin injertar, tanto del patrón como de la variedad.

#### **4.3.5 Análisis anatómico**

Se obtuvieron muestras de tallo de aproximadamente 0.5 cm de longitud, de cada sección (por arriba, por debajo y punto unión), en cada tipo de injerto, se muestrearon tres árboles por cada tratamiento (injertos) y un árbol de cada uno de los testigos. La microtecnia usada fue la descrita por Berlyn y Miksche (1976) y Ruzin (1999), se hicieron cortes transversales entre 13 a 15  $\mu\text{m}$ . Las muestras fueron observadas y analizadas empleando un foto microscopio III Carl Zeiss con una cámara digital para microscopia PAXcam3. Las variables evaluadas fueron: número de vasos, diámetro de vasos (10 mediciones), número de radios, ancho de radio (tres mediciones), grosor de corteza (3 mediciones), se evaluaron tres arboles injertados, considerando a un árbol como una repetición.

#### **4.3.6 Cuantificación de azúcares solubles totales**

La determinación de azúcares solubles totales se hizo por medio del método de Antrona (Montreuil et al. 1997). Se tomaron muestras de tres injertos de aproximación, tres injertos de púa invertida, y un árbol testigo Nayarit y un árbol testigo 'Enana Roja Cubana'. Por cada planta se colectaron de cada sección cinco muestras de aproximadamente 0.5 cm cada una, para hacer un total de 15 muestras por planta. Las lecturas de absorbancia se hicieron a 625 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Evolution 300, Thermo). El contenido de azúcares se expresó en  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de materia seca.

#### **4.3.7 Glucosa, fructosa y sacarosa**

La cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa se realizó a partir de los extractos usados en la cuantificación de azúcares solubles totales, y se realizó enzimáticamente por la adición secuencial de hexocinasa, fosfoglucoisomerasa e invertasa de acuerdo al método de Scholes et al. (1994). Las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro lector de microplacas (Varioskan Flash, Thermo Scientific) a una absorbancia de 340 nm. Los cálculos se realizaron mediante curvas estándares de calibración preparadas previamente para cada uno de los azúcares y se expresaron en  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de materia seca.

#### **4.3.8 Determinación de Compuestos fenólicos totales**

La determinación se hizo por medio de la reacción oxido-reducción de Folin-Ciocalteu. Las muestras se obtuvieron de la misma forma que para el análisis de cuantificación de azúcares. Cada muestra se molió y maceró con 1.5 mL de etanol al 95 % por 24 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se siguió la metodología descrita por Nielsen (1988). Por cada extracto se realizaron dos replicas, la reacción se hizo en oscuridad. Las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro UV-Visible (Evolution 300, Thermo Scientific) a una absorbancia de 725 nm. Los resultados se expresaron en  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de materia seca.

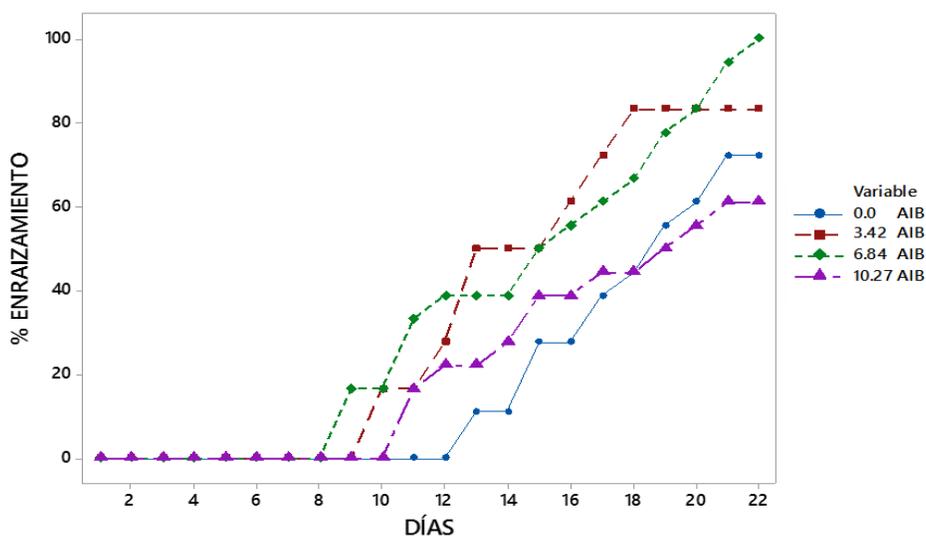
#### **4.3.9 Análisis estadísticos**

Todos los resultados fueron sujetos a análisis de varianza (ANOVA) y para la separación de medias se utilizó la prueba de Tukey. Se usó el paquete estadístico Statistical Analysis System (SAS), versión 9.

## 4.4 RESULTADOS

### 4.4.1 Enraizamiento *in vitro*

En la Figura 4.1 se muestran el efecto de cada uno los tratamientos con AIB sobre el tiempo de enraizamiento del portainjerto Nayarit. En el tratamiento T2 las primeras raíces emergieron a los 8 días de iniciado los tratamientos, se alcanzó un 100% de enraizamiento a los 22 días. Seguido del tratamiento T1 en el cual las primeras raíces emergieron a los 9 días, se obtuvo el 83% de enraizamiento. En el tratamiento T0 las primeras raíces desarrollaron a los 12 días, con 72% de enraizamiento al final del periodo de evaluación. El T4 obtuvo el menor porcentaje de enraizamiento (61%), sin embargo, las primeras raíces se observaron a los 10 días de iniciado los tratamientos.



**Figura 4.1** Efecto de la concentración de AIB sobre el enraizamiento *in vitro* del portainjerto Nayarit, 22 días después del inicio de los tratamientos.

Respecto al número y longitud de raíces se encontraron diferencias significativas (Cuadro 4.1), el tratamiento T1 fue el que mayor número de raíces obtuvo en comparación con el resto de los tratamientos. En cuanto a la longitud de las mismas el tratamiento T2 fue el que obtuvo

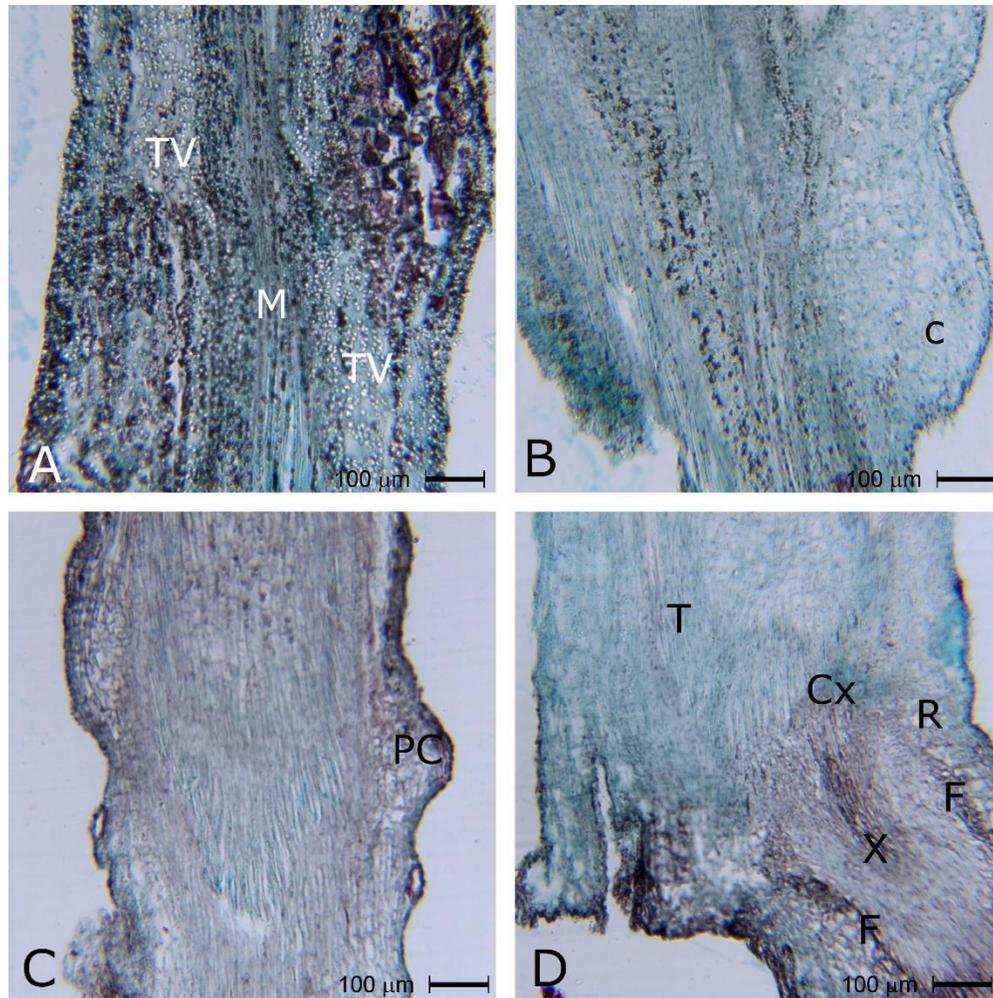
las raíces más largas respecto al resto de los tratamientos. Para la variable porcentaje de enraizamiento se obtuvieron diferencias altamente significativas, el T2 fue el que mayor porcentaje tuvo, estos resultados se observan en la Figura 4.1.

**Cuadro 4.1** Comparación de medias de las diferentes concentraciones de AIB, para las variables número y longitud de raíces y porcentaje de enraizamiento.

Tratamiento	Número de raíces	Longitud de Raíces (cm)	Porcentaje de enraizamiento (%)
<b>T0</b>	1.77 ab	1.61 c	72 c
<b>T1</b>	1.93 a	1.82 b	88 b
<b>T2</b>	1.68 bc	2.14 a	100 a
<b>T3</b>	1.53 c	1.44 c	61 d
<b>DSH</b>	0.194	0.2	0

Valores con la misma letra dentro de la misma columna no presenta diferencias significativas (Tukey  $\alpha=0.05$ ); DSH= Diferencia Significativa Honesta. T0= 0.0, T1= 3.42, T2= 6.84, T3= 10.27  $\mu\text{mol}$  de AIB.

En cuanto al análisis de anatomía en la Figura 4.2A se observa la estructura anatómica en corte longitudinal en el día 0 antes de la aplicación de AIB, la médula y el tejido vascular del tallo con estructura normal. Después de cuatro días de iniciado el tratamiento (Figura 4.2B) se detectó la formación de callo en la base del tallo, esta formación de callo permaneció durante los siguientes cinco, seis y siete días. En el día 7 también se observó que el parénquima cortical proliferó masivamente (Figura 4.2C). En el día 9 se observó la aparición de una raíz adventicia (Figura 4.2D), es preciso señalar que este proceso de rizogénesis no es uniforme ni continuó en todas las muestras, ya que cada explante responde de forma diferente y única. Anatómicamente la raíz adventicia presentó todas sus estructuras: el cilindro vascular central (xilema y floema secundarios), corteza de la raíz y rizodermis, conectada al tallo.



**Figura 4.2** Secciones longitudinales de la base de tallo del portainjerto Nayarit, tomadas de 0-8 días para el tratamiento  $6.84 \mu\text{mol}$  de AIB (T2) durante la inducción del enraizamiento. (A) Estructura anatómica de tallo al momento de la inducción (Día 0). (B) Base del tallo a los cuatro días después de iniciado los tratamientos, formación de callo (c) en epidermis. (C) Proliferación del parénquima cortical (PC), en el día 7 después de la inducción de enraizamiento. (D) Formación de la raíz adventicia (R) 8 días después de inicio de los tratamientos. Abreviaciones: M=médula, TV= tejido vascular del tallo, c= callo, PC= parénquima cortical, T= tallo, R= raíz adventicia, Cx= conexión de la raíz adventicia con el tallo, X= xilema, F= floema.

#### 4.4.2 Estudio anatómico de compatibilidad de injertos

En el Cuadro 4.2 se muestra la comparación de medias para los tipos de injertos utilizados púa invertida y aproximación, para cada una de las variables anatómicas evaluadas. No hubo diferencias significativas para ninguna de las variables.

**Cuadro 4.2** Comparación de medias de las características anatómicas de la madera y del floema secundario en el estudio de compatibilidad de guayabo: ‘Enana roja cubana’ injertada sobre Nayarit.

<b>Tipo de Injerto</b>	<b>Número de vasos</b>	<b>Diámetro de vasos (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Número de radios</b>	<b>Ancho de radio (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Grosor de floema secundario (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>Púa Invertida</b>	12.66 a	20.38 a	2.66 a	11.83 a	132.20 a
<b>Aproximación</b>	13.83 a	20.13 a	2.16 a	14.17 a	162.23 a
<b>DSH</b>	2.66	3.69	0.64	3.82	37.34

Valores con la misma letra dentro de la misma columna no presenta diferencias significativas (Tukey  $\alpha= 0.05$ ); DSH= Diferencia Significativa Honesta.

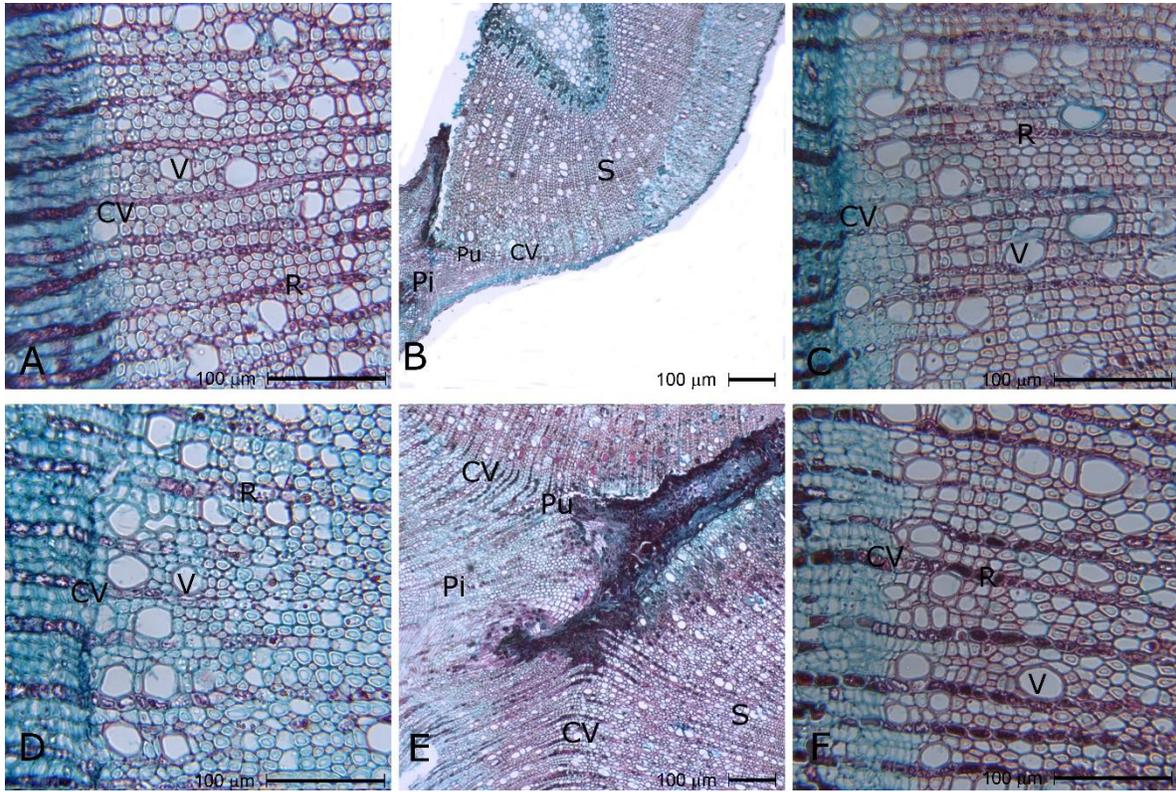
En lo que respecta a las diferentes secciones (debajo y arriba del punto de unión) en la interacción ‘Enana roja cubana’ sobre Nayarit (Cuadro 4.3), no se encontraron diferencias significativas para ninguna de las variables evaluadas. Para los testigos tampoco se encontraron diferencias significativas.

En la figura 4.3 se observan los cortes anatómicos (transversal) de los tipos de injerto, donde se muestra el punto de unión de cada uno de los injertos (Figura 4.3B y D), donde se aprecia el desarrollo de un nuevo cámbium vascular (CV).

**Cuadro 4.3** Comparaciones de medias para las variables anatómicas observadas en cortes transversales en madera de guayabo: ‘Enana roja cubana’ injertada sobre Nayarit, y de los testigos.

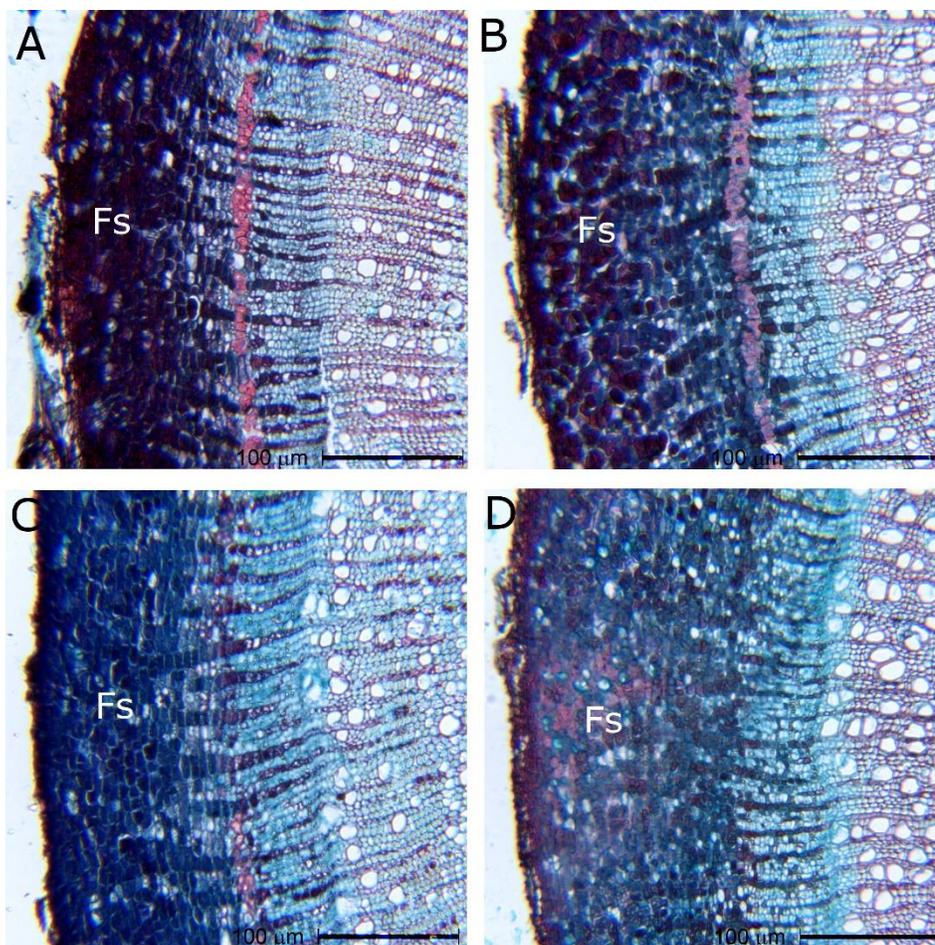
	Sección	Número de vasos	Diámetro de vasos (µm)	Número de radios	Ancho de radio (µm)	Grosor de floema secundario (µm)
<b>‘Enana roja cubana’/Nayarit</b>	Debajo del punto de unión	13.0 a	19.3 a	2.5 a	13.2 a	134.9 a
	Arriba del punto de unión	13.5 a	21.1 a	2.3 a	12.7 a	161.4
	DSH	3.46	4.14	0.62	4.43	47.17
<b>Testigo Nayarit</b>	Debajo del punto de unión	15.3 a	15.2 a	2.6 a	12.6 a	202.6 a
	Arriba del punto de unión	16.6 a	14.7 a	2.0 a	12.6 a	202.6 a
	DSH	2.61	3.87	0.92	8.0	50.38
<b>Testigo ‘Enana roja cubana’</b>	Debajo del punto de unión	13.00 a	13.33 a	2.33 a	15.36 a	547.10 a
	Arriba del punto de unión	14.66 a	14.06 a	1.66 a	15.36 a	547.10a
	DSH	3.56	3.67	3.95	2.79	39.45

Valores con la misma letra dentro de la misma columna no presenta diferencias significativas (Tukey  $\alpha= 0.05$ ); DSH= Diferencia Significativa Honesta.



**Figura 4.3** Cortes transversales mostrando la madera (xilema secundario) del Injerto Púa invertida (A) debajo del punto de unión, (B) punto de unión, (C) arriba del punto de unión. Injerto Aproximación (D) debajo del punto de unión, (E) punto d unión, (F) arriba del punto de unión. CV= Cámbium vascular, V= elementos de vaso, R=radios. Pu= Punto de unión, Pi= Portainjerto, S=Vareta.

En la Figura 4.4, se muestra el grosor del floema secundario para cada uno de los tipos de injerto, púa invertida (Figura 4.4A y B) y aproximación (Figura 4.4C y D), donde se aprecia que el floema secundario es más abundante o desarrollado por arriba del punto de unión, lo cual concuerda con los resultados presentados en el Cuadro 4.3.



**Figura 4.4** Cortes transversales de la madera y corteza de tipos de injerto. Grosor de floema secundario (Fs). Injerto Púa invertida (A) debajo del punto de unión, (B) Arriba del punto de unión. Injerto Aproximación (C) debajo del punto de unión, (D) Arriba del punto de unión.

#### 4.4.3 Azúcares solubles totales (AST) y compuestos fenólicos totales (CFT)

En el Cuadro 4.4 se muestran los resultados obtenidos de la comparación de medias para los tipos de injerto utilizados púa invertida y aproximación, para cada una de las variables evaluadas, se obtuvieron diferencias significativas para AST donde la mayor concentración se observó en el tipo de injerto de aproximación. Sin embargo, respecto a la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa fue mayor en el injerto de púa invertida. El azúcar que se encuentra en mayor cantidad para los dos tipos de injertos es sacarosa. Mientras que para la

CFT se obtuvieron diferencias significativas, siendo el injerto de aproximación el que tuvo la concentración más alta.

**Cuadro 4.4** Comparaciones de medias de la concentración de azúcares y compuestos fenólicos totales en los dos tipos de injerto de ‘Enana roja cubana’ injertada sobre Nayarit.

Tipo de Injerto	Azúcares			Fenoles	
	solubles totales (g·100g <sup>-1</sup> )	Glucosa (g·100g <sup>-1</sup> )	Fructosa (g·100g <sup>-1</sup> )	Totales (g·100g <sup>-1</sup> )	
<b>Púa Invertida</b>	1.99 b	0.35 a	0.26 a	0.49 a	0.95 b
<b>Aproximación</b>	2.22 a	0.30 b	0.23 b	0.47 b	1.11 a
<b>DSH</b>	0.16	0.003	0.02	0.05	0.08

Valores con la misma letra dentro de la misma columna no presenta diferencias significativas (Tukey  $\alpha= 0.05$ ); DSH= Diferencia Significativa Honesta.

En la comparación de medias para cada sección (Cuadro 4.5), en la interacción ‘Enana roja cubana’ injertada sobre Nayarit, se obtuvieron diferencias significativas para la variable AST, donde la mayor acumulación fue en el punto de unión. El azúcar que más se acumuló fue sacarosa, en el punto de unión y por arriba del punto de unión. Por otro lado la CFT fue diferente ( $p\leq 0.5$ ) y la mayor concentración se detectó en el punto de unión. En el testigo Nayarit sin injertar para la variable AST se observaron diferencias significativas (Cuadro 4.5), donde la mayor acumulación se presentó en la zona por arriba de donde debería estar el punto de unión. Los resultados para la acumulación de glucosa, fructosa y sacarosa fueron similares, la mayor concentración fue por arriba del punto de unión. La acumulación de CFT presento diferencias significativas y fue de manera ascendente, la menor acumulación fue debajo del punto de unión, después donde debería estar el punto de unión la mayor acumulación por arriba del punto de unión. En el testigo sin injertar de ‘Enana roja cubana’,

la concentración de AST no se obtuvieron diferencias significativas, la mayor acumulación fue por arriba de donde debería estar el punto de unión. De los azúcares, solo la sacarosa tuvo diferencias significativas, y la mayor concentración estuvo por arriba del punto de unión. La concentración de CFT no mostro diferencias significativas, y se distribuyó de manera uniforme a través del tallo.

**Cuadro 4.5** Comparación de medias para la concentración de azúcares solubles totales, glucosa, fructosa, sacarosa y compuesto fenólicos totales (CFT) en ‘Enana roja cubana’ injertada sobre Nayarit, y los testigos en las posiciones arriba, debajo y en el punto de unión.

Tratamiento	Sección	Azúcares solubles				CFT (g·100g <sup>-1</sup> )
		totales (g·100g <sup>-1</sup> )	Glucosa (g·100g <sup>-1</sup> )	Fructosa (g·100g <sup>-1</sup> )	Sacarosa (g·100g <sup>-1</sup> )	
<b>‘Enana roja cubana’/Cass</b>	Debajo del punto de unión	2.05 b	0.031 b	0.23 b	0.30 b	0.88 b
	Punto de unión	2.52 a	0.028 b	0.23 b	0.57 a	1.27 a
	Arriba del punto de unión	1.73 c	0.041 a	0.27 a	0.56 a	0.95 b
	DSH	0.23	0.004	0.03	0.07	0.12
<b>Testigo Nayarit</b>	Debajo del punto de unión	1.61 b	0.031 a	0.18 b	0.16 b	1.15 c
	Punto de unión	1.27 c	0.023 b	0.15 b	0.15 b	1.49 b
	Arriba del punto de unión	1.74 a	0.036 a	0.23 a	0.20 a	1.53 a
	DSH	0.36	0.013	0.08	0.05	0.38
<b>Testigo ‘Enana roja cubana’</b>	Debajo del punto de unión	2.47 b	0.01 a	0.07 a	0.24 b	1.07 a
	Punto de unión	2.58 b	0.01 a	0.08 a	0.25 ab	1.13 a
	Arriba del punto de unión	3.13 a	0.01 a	0.08 a	0.31 a	1.23 a
	DSH	0.29	0.002	0.01	0.06	0.26

Valores con la misma letra dentro de la misma columna por tratamiento no presenta diferencias significativas (Tukey  $\alpha= 0.05$ ); DSH= Diferencia Significativa Honesta.

## 4.5 DISCUSIÓN

### 4.5.1 Cinética de enraizamiento *in vitro*

En la fase de enraizamiento se busca la formación de raíces con el fin de convertir los brotes en plántulas completas. Los requerimientos de auxinas durante esta fase, en guayabo están influenciados por el origen de los explantes, el tipo y la concentración de reguladores de crecimiento aplicados durante las fases de establecimiento y multiplicación, además de la edad de la planta (Amin y Jaiswal 1987, Ali et al. 2003). Shah et al. (2008) encontraron que para el Cv. Safeda de guayabo la combinación de AIB y ácido naftalenacético (ANA) en concentraciones de 1.5 y 0.5 mg.L<sup>-1</sup> respectivamente, además fue mejora para obtener 85% de explantes enraizados. Rodríguez et al. (2006) también enraizaron brotes de la variedad 'Cotorrera' agregando al medio de cultivo 0.98 µmol de AIB y 1.14 µmol de AIA al medio de cultivo. Datos que no concuerdan con los resultados obtenidos para el portainjerto Nayarit ya que la cantidad de AIB para estimular el enraizamiento fue mayor (6.84 µmol).

Liu y Yang (2011) indujeron el enraizamiento *in vitro* de guayabo cultivar Beaumont a los 12 días después del estímulo usando un medio MS al 50% sin auxinas, obtuvieron a los 30 días 65% de enraizamiento, estos resultados difieren a los nuestros, ya que la primer raíz emergió a los 8 días después de la inducción (T2) registrando un 100% de enraizamiento a los 22 días, indicando que se requiere el uso de auxinas. El tiempo de inducción también es importante, ya que altas concentraciones de auxinas en el medio de cultivo limitan el desarrollo de las mismas, al respecto Mishra et al. (2007) mencionan que el desarrollo de raíces *in vitro* de guayabo fue conseguido a los 17 días usando una concentración de 49.2 µmol de AIB y 30 días usando 123 µmol.

Las respuestas que se producen tras la aplicación de auxinas a las plantas dependen de la concentración de la hormona. Concentraciones por arriba del óptimo reducen el crecimiento hasta inhibirlo, llegando a producir incluso la muerte del explante (Acosta et al. 2008).

El estudio anatómico se realizó solo para el mejor tratamiento (T2), en el cual el enraizamiento fue más rápido (8 días después de iniciado el tratamiento) y porcentaje (100%), sin embargo, con los resultados obtenidos en el análisis anatómico se puede deducir que no todos los explantes responden de la misma forma al tratamiento (Figura 2), ya que no presentan una secuencia, por lo que la formación de primordios radicales no es clara. Se presentan cambios en los tejidos que demuestran que los explantes responden satisfactoriamente al estímulo con auxinas (AIB) (Figura 2D), como lo muestra el estudio realizado por Naija et al. (2008) en el portainjerto MM106 de manzano donde por medio de un estudio anatómico evidencian que la inducción de enraizamiento ocurrió en el día 3 después de una inducción con AIB. Goncalves et al. (1998) trabajaron con explantes de castaño (*Castanea sativa* x *C. crenata*) donde observaron de manera secuencial los cambios anatómicos ocurridos durante la inducción del enraizamiento, el cual fue con AIB, las primeras divisiones se observaron a las 24 horas de inducción, formación de meristemoide entre 3-4 días, identificaron primordios radicales después de 6-8 días, a los 12 días observaron raíces con todos sus tejidos bien organizados, estas raíces conectadas al tallo. Además, en este trabajo encontramos una conexión entre el tallo y la raíz, lo cual es importante ya que Nayarit es un portainjerto (Figura 2D).

#### **4.5.2 Estudio de compatibilidad de injertos: anatomía, azúcares solubles totales (AST) y compuestos fenólicos totales (CFT)**

De acuerdo con nuestros resultados el tipo de injerto utilizado es importante ya que se obtuvieron diferencias entre los mismos (púa invertida y aproximación), para las variables AST y CFT, sin embargo, para las variables anatómicas no se encontraron diferencias y ambos tipos de injertos son compatibles, resultados que concuerdan con López et al. (2008), que utilizaron dos métodos de injertos en sandía (púa y aproximación) los cuales no influyeron en la sobrevivencia de la planta. En contraste Canessa y Castro (2008) mencionan que el tipo de injerto usado influyó en la compatibilidad de injertos en pistacho.

Respecto a las diferentes secciones analizadas en este estudio (debajo del punto de unión, punto de unión y arriba del punto de unión), tanto para los injertos como para los testigos, no se encontraron diferencias ( $p \leq 0.5$ ) en ninguna de las variables anatómicas evaluadas, lo que permite afirmar que hay compatibilidad entre los tejidos, además de que se observó desarrollo y diferenciación en el cambium vascular. El portainjerto y la vareta se unieron bien que las regiones del cambium vascular de ambas coinciden, una vez que esto ocurre hay una proliferación de células parenquimatosas, formando un callo. Las nuevas células se diferencian a partir del cambium del callo recién formado. El último proceso para la formación del injerto ocurre con la formación de un nuevo xilema y floema, que permite la conexión vascular entre el portainjerto y la vareta. Todos estos pasos son considerados como el requisito básico para un injerto exitoso, desde el punto de vista anatómico (Yeoman 1984, Tiedemann 1989 Pina y Errea 2005). Pina et al. (2012) caracterizaron las primeras señales celulares de incompatibilidad de injertos del género *Prunus* basada principalmente en pruebas histoquímicas y cuantificación de la comunicación celular a través de plasmodemas,

encontrando una semana después de la injertación adhesión y proliferación de callo producido tanto en injertos compatibles como incompatibles. Sin embargo, no se observó formación de nuevo cambium vascular derivado del tejido calloso en injertos incompatibles. Chen et al. (2016) demostraron que la compatibilidad anatómica en injertos de Litchi está relacionada con la formación de tejidos vasculares en el punto de unión del injerto. Por su parte Trinchera et al. (2013) describieron el proceso de afinidad entre injerto y portainjertos para alcachofa, 3 días después observaron la aparición de muchas estructuras de interconexión entre los dos componentes de injerto, seguido por un reordenamiento vascular y un desarrollo de callo durante la unión del injerto, la formación de *novos* de muchos plasmodesmas entre injerto y patrón confirmó su alta compatibilidad.

Sin embargo, algunos injertos incompatibles pueden crecer durante varios años, sin síntomas visibles de incompatibilidad, incluso con conexiones vasculares funcionales (Hartmann et al. 1997), las causas de esta incompatibilidad pueden ser otras, como bioquímicas o fisiológicas. El uso de marcadores bioquímicos pueden ser de utilidad para diagnosticar la incompatibilidad durante una etapa temprana de desarrollo del injerto (Darikova et al. 2011). De acuerdo con nuestros resultados se encontraron diferencias en las diferentes secciones de los injertos, la concentración de AST fue mayor en el punto de unión, después por debajo del punto de unión y por último, por arriba del punto de unión, sin embargo, la concentración de azúcares no puede ser utilizados como un marcador para detectar la compatibilidad temprana entre el patrón y la vareta, debido a que el contenido de azúcares es una característica propia del cultivar (Ciobotari et al. 2010). Los testigos presentaron concentraciones similares o incluso más altas de azúcares que las plantas injertadas. Por otro lado Olmstead et al. (2010) menciona que la concentración de azúcares sobre todo en el punto de unión y por arriba de

este, podría ser un parámetro entre injertos compatibles e incompatibles, ya que esta concentración se reflejara en el crecimiento vegetativo y reproductivo. La sacarosa fue el azúcar que se encontró en mayor concentración, tanto en los injertos como en los testigos evaluados, y esto se relaciona con que la sacarosa desempeña un papel importante como fuente de carbono y energía para los tejidos no fotosintéticos y es fundamental para el metabolismo de la planta (Park et al. 2009).

Por otro lado, en cuanto a la acumulación de compuestos fenólicos totales (CFT), se encontraron diferencias entre los tipos de injertos, el injerto por aproximación fue el que mayor cantidad de fenoles acumulo. Lo cual puede estar relacionado con el corte que se hizo al momento de realizar el injerto, el cual fue más grande en comparación con el injerto de púa invertida. Lo que indica que la herida a cicatrizar fue mayor, y por lo tanto la acumulación de fenoles fue mayor. Otro índice importante de evaluar en el CFT en cada una de las secciones del injerto, donde se encontró que en el punto de unión fue donde hubo mayor acumulación. Sin embargo, esta acumulación en el punto de unión no limito la diferenciación del callo. En estudios realizados en injertos incompatibles de cerezo (*P. avium* sobre *P. cerasus*), se encontró una acumulación de prunina (compuesto fenólico) en el punto de unión (Treutter y Feucht, 1991). En estudios de incompatibilidad de cerezo Mng'omba et al. (2008) mencionan que en injertos de *Uapaca kirkina* la incompatibilidad se atribuye a altas concentraciones de flavonoides y ácido cumárico acumulado en el punto de unión. Algunas polifenoles inhiben el transporte de auxinas (Eckardt, 2006; Wasson et al, 2006), lo que da como resultados un raquítrico crecimiento de injertos incompatibles dado su reducido contenido de auxina, la cual afecta la diferenciación de elementos vasculares como a la lignificación (Mattson et al, 2003). La acumulación de CFT también ocurre en respuesta de

defensa de la planta, a diferentes tipos de estrés, a condiciones ambientales, al estado fisiológico del tejido, así como al manejo de los huertos (Michalek et al. 1999), y dado que nuestros resultados solo se basaron en una cuantificación CFT, no es posible asegurar algún tipo de incompatibilidad.

Los estudios de detección de compatibilidad o incompatibilidad de injertos, es un proceso muy complejo, que requiere de diversos análisis para poder detectarla a tiempo. Estudios anatómicos, el uso de marcadores bioquímicos, son algunos de los métodos que pueden ser empleados para la detección temprana, se debe considerar la especie, ya que también es un factor que interviene en la compatibilidad o incompatibilidad.

Por lo que podemos concluir que en esta investigación se mejoró el enraizamiento *in vitro* del portainjerto Nayarit mediante la inducción con AIB, además el estudio anatómico permitió verificar la conexión entre tallo y raíz. También, se realizaron diferentes análisis que permitieron inducir que existe compatibilidad de la Var. 'Enana roja cubana' injertada sobre Nayarit, sin embargo, es necesario hacer estudios más detallados sobre el tipo y contenido de fenoles, que en un futuro puedan afectar al injerto.

#### 4.6 LITERATURA CITADA

- Acosta EM, Sánchez BJ, Bañón AM (2008) Auxinas, pp.421-444. In:Fundamentos de fisiología vegetal. Azcon-Bieto J, Talón M. McGraw-Hill. Barcelona, España.
- Ali N, Mulwa RMS, Norton MA, Skirvin RM (2003) Micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.) Journal of Horticultural Science & Biotechnology 78:739-741.
- Amin MN, Jaiswal VS (1987) Rapid clonal propagation of guava through in vitro shoots proliferation on nodal explants of mature trees. Plant Cell Tissue and Organ Cult. 9: 235-244.
- Avelar M J, Téliz O D, Zavaleta M E (2001) Patógenos asociados con el “declinamiento del guayabo”. Revista mexicana de Fitopatología 19(2): 223-229.
- Berlyn GP, Miksche JP (1976) Botanical microtechnique and cytochemistry. Iowa State, University Press. Ames. U.S.A. 326p.
- Canessa FD, Castro V M (2008) Evaluación de diferentes tipos de injertos en pistacho (*Pistacia vera* L.), utilizando las variedades Peters, Kerman y Aegina sobre *pistacia terebinthus* en tres épocas del año. Simiente 78: 1-8.
- Chen B, Jietang Z, Yonghua Q, Guibing H (2016) Study on the graft compatibility between ‘Jingganghongnuo’ and other litchi cultivars Zhe. Scientia Horticulturae. 199:56–62.
- Ciobotari G, Brianza M, Morariu A, Gradinariu G (2010) Graft incompatibility influence on assimilating pigments and soluble sugars amount of some pear (*Pyrus sativa*) Cultivars. Notulae Botanicae Horti Agrobotanic Cluj 38(1):187-192.
- Concepción LO, Nápoles BL, Pérez MA, Hernández M, Peralta N, Trujillo SR (2005) Efecto de tres antioxidantes en el cultivo in vitro de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.). Relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. Cultivos Tropicales 26:33-39.

- Darikova JA, Savva YV, Vaganov EA, Grachev AM, Kuznetsova GV (2011) Grafts of woody plants and the problem of incompatibility between scion and rootstock. *Journal of Siberian Federal University. Biology* 1(4): 54-63.
- Domínguez AJL, Aguilar SG, Nieto AD, Legaria SJP, Pineda PJ (2010) Utility of RAPD DNA Markers in the Selection of Grafts of the Mexican Guava Cultivar 'Media China' without Symptoms of Deficiency for Iron and Zinc. *Acta Horticulturae*. 849: 203-210.
- Eckardt NA (2006) The role of flavonoids in root nodule development and auxin transport in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 18(7): 1539-1540.
- Errea P (1998) Implications of phenolic compounds in graft incompatibility in fruit tree species. *Sci Hort* 74:195-205.
- Errea P, Garay L, Marin JA (2001) Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*) using in vitro techniques. *Physiol Plant* 112:135–141.
- Fioravanzo JC, Paiva MC, Manica I (1995) Goiaba: aspectos qualitativos. *Cad. Hortic. Univ. Fed. R. G. Sul*. 3 (3):1-12.
- Goncalves JC, Diogo G, Amancio S (1998) In vitro propagation of chestnut (*Castanea sativa* x *C. crenata*) : Effects of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. *Scientia Horticulturae* 72: 265–27.
- Hartmann HT, Kester DE, Davies FT, Geneve RL (1997) *Plant Propagation. Principles and Practices*, sixth ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 570p.
- Liu X, Yang G (2011) Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L) on nodal explants of mature elite cultivar. *Int J Plant Biol* 2(2): 7-11.

- López EJ, Romo AA, Domínguez SJ (2008) Evaluación de métodos de injerto en sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) sobre diferentes patrones de calabaza. IDESIA 2: 13-18.
- Manica I (2000) Taxonomía a goiabeira. Pp 23-26 In: Fruticultura y tropical, goiaba. Manica I (ed). Ed. Cinco Continentes, LTDA., Porto Alegre, Brazil. 374 p.
- Mattsson J, Ckurshumova W, Berleth T (2003) Auxin signaling in Arabidopsis leaf vascular development. Plant Physiology 131(3): 1327-1339.
- Michalek S, Mayr U, Treutter D, Lux-Endrich A, Gutmann M, Feucht W, Geibel M (1999) Role of flavan-3-ols in resistance of apple trees to *Venturia inaequalis*. Acta Hort 484: 535-539.
- Mishra DS, Tiwari JP, Shant L (2007) *In vitro* cloning of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Pant Prabhat. Acta Hort 735: 127-132.
- Mng'omba S, du Toit E, Akinfesi F (2008) The relationship between graft incompatibility and phenols in *Uapaca kirkiana* Müell Arg. Sci Hort 117: 212-218.
- Montreuil J, Spik G, Fournet B, Toillier T (1997) Nonenzymatic determinations of carbohydrates. pp. 112-114. In: Multon L (Ed) Analysis of Food Constituents. Wiley-VCH. USA.
- Naija S, Elloumi N, Jbir N, Ammar S, Kevers C (2008) Anatomical and biochemical changes during adventitious rooting of apple rootstocks MM 106 cultured in vitro. C. R. Biologies 331:518-525.
- Nielsen S (1998) Food Analysis. Purdue University. Indiana. USA. 556p.
- Olmstead MA, Lang SN, Lang GA (2010) Carbohydrate profiles in the graft union of young sweet cherry trees grown on dwarfing and vigorous rootstocks. Sci Hort 124:78-82.
- Park JY, Canam T, Kang KY, Unda F, Mansfield S (2009) Sucrose phosphate synthase expression influences poplar phenology. Tree Physiol 29:937-946.

- Pina A, Errea P (2005) A review of new advances in mechanism of graft compatibility-incompatibility. *Sci Hort.* 106:1-11.
- Pina A, Errea P, Martens HJ (2012) Graft union formation and cell-to-cell communication via plasmodesmata in compatible and incompatible stem unions of *Prunus* spp. *Scientia Horticulturae.* 143: 144–150.
- Rodríguez NN, Velázquez B, Cabrera I (2006) Multiplicación *in vitro* de *Psidium guajava* L. ‘Cotorrera’ a partir de explantes nodales. *Revista CITRIFRUT* 23(2):45-52.
- Ruzin SE (1999) *Plant Microtechnique and Microscopy.* Oxford University Press, New. U.S.A. 322p.
- Scholes JD, Lee PJ, Horton P, Lewis DH (1994) Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytol* 126: 213-222.
- Shah ST, Zamir R, Ahmad J, Ali H, Lutfullah G (2008) In vitro regeneration of plantlets from seedling explants of guava (*Psidium guajava* L.) cv Safeda. *Pak. J. Bot.* 40:1195-1200.
- Tiedemann R (1989) Graft union development and symplastic phloem contact in the heterograft *Cucumis sativus* on *Curcubita ficifolia*. *J Plant Physiol* 134: 427–440.
- Treutter D, Feucht W (1991) Accumulation of Phenolic-Compounds above the Graft Union of Cherry Trees. *Gartenbauwissenschaft* 56(3): 134-137.
- Trinchera A, Pandozy G, Rinaldi S, Crinó P, Temperini O, Rea E (2013) Graft union formation in artichoke grafting onto wild and cultivated cardoon: An anatomical study. *Journal of Plant Physiology* 170: 1569– 1578.
- Wasson, AP, Pellerone FI, Mathesius U (2006) Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *Plant Cell* 18 (7): 1617-1629.

Yeoman MM (1984). Cellular recognition systems in grafting. In: Linkskens HF, Heslop-Harrison I (Eds) Cellular Interaction, Encyclopaedia of Plant Physiology, New Series, vol. 17. Springer-Verlag, Berlin, pp. 453–472.

## CAPITULO V

### EFECTO DE LOS PORTAINJERTOS CASS Y NAYARIT INJERTADOS SOBRE DIFERENTES SELECCIONES DE GUAYABO

#### 5.1 INTRODUCCIÓN

El guayabo (*Psidium guajava* L.) es uno de los cultivos más importantes del genero *Psidium* y de la familia Myrtaceae, que se desarrolla en las zonas tropicales y subtropicales del mundo (José y Priya, 2011). La guayaba posee grandes cantidades de vitaminas y minerales, y tiene tan altos niveles de antioxidantes polifenólicos (Hassimotto et al. 2005). Esta especie es de importancia comercial en la India, China, México, Indonesia, Sudáfrica, Egipto, Yemen, Brasil, Colombia, Antillas, Cuba, Venezuela, Nueva Zelanda, Filipinas, Vietnam y Tailandia (Le et al. 1998). En México existe una gran variabilidad de especies del género *Psidium*, la especie distribuida más ampliamente es *P. guajava* L., seguida de: *P. sartorianum*, *P. guineense* Swartz, *P. friedrichsthalianum* (Berg.) Nied., *P. salutare*, *P. hypoglaucum*, *P. galapageium*, *P. cattleianum* Sabine, y *P. cattleianum* Lucidum, la mayoría de estas especies poseen una excelente adaptación a un muy amplio rango de suelo y clima, pueden comportarse como árbol caducifolio y perennifolio a la vez, según la disponibilidad de humedad. Esta capacidad de respuesta del guayabo a las diferentes condiciones ambientales puede estar asociada también a la enorme variabilidad genética existente en México por ser uno de los probables centros de origen de la especie (Hayes, 1960; Popenoe, 1974).

En México la producción de guayaba, está basada casi exclusivamente en el cultivar conocido como ‘Media China’, tanto para consumo en fresco, como para la industria, por lo que es importante la diversificación de variedades y selecciones (Padilla et al. 2002). Sin embargo, en guayabo existen problemas importantes con el ataque de nematodos, ya que pueden acabar con plantaciones completas (Avelar et al. 2001), y problemas de fertilidad en los suelos (Manica 2000), lo que conlleva a requerir de portainjertos que solucionen todos o algunos de estos problemas. Dentro de la diversidad del género *Psidium* encontramos a Cass (*Psidium friedrichsthalianum* (Berg.) Nied), susceptible de ser propagada y aprovechar su rusticidad y vigorosidad para ser utilizada como portainjerto, ya que tiene la característica de ser tolerante al ataque de los nematodos (Bocantes y Mora 2010). En México se cuenta con el genotipo Nayarit (*P. guajava*), que es resistente a deficiencias nutrimentales, principalmente zinc (Domínguez et al. 2010).

Con base en lo anterior y considerando que la elección del mejor portainjerto representa uno de los problemas más complejos de la fruticultura, la presente investigación planteo como objetivo detectar la compatibilidad/ incompatibilidad de la de diferentes genotipos de guayabo injertados sobre Cass y guayaba Nayarit mediante un análisis de azúcares solubles y de fenoles totales.

## **5.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.2.1 Material Vegetal**

Se utilizaron dos genotipos como portainjertos pertenecientes al género *Psidium*, la selección Nayarit (*P. guajava* L.) y Cass (*P. friedrichsthalianum* (Berg.) Nied). Además de *Psidium* ¿?, la variedad ‘Enana Roja Cubana’, el genotipo Pm12 y Roja Exterior Redonda (RER) (Cuadro 5.1).

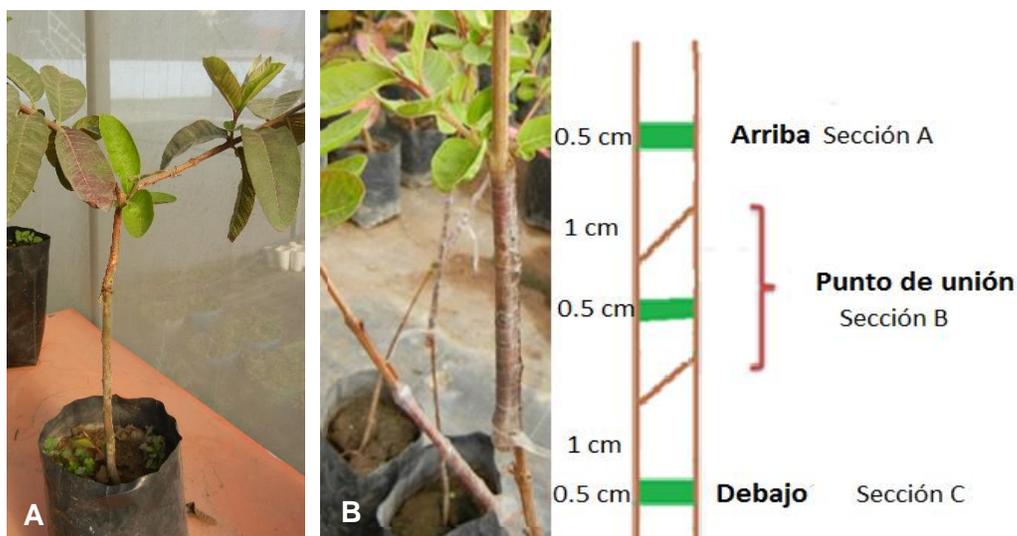
**Cuadro 5.1** Características de los genotipos utilizados como portainjertos y varetas.

Genotipo	Lugar de Colecta	Características
Selección Nayarit	Rosa Morada, Nayarit.	Portainjerto, planta resistente a la peca de la guayaba, causada por deficiencia nutrimentales,
Cass	Yautepec, Morelos.	Portainjerto, planta resistente al ataque por nematodos.
‘Enana roja Cubana’	Ciego de Ávila, Cuba.	Fruto de pulpa roja, epidermis rugosa amarilla al madurar. Peso del fruto mayor a 250g, fruto firme.
Pm 12	Vitoria de la Conquista, Brasil.	Fruto de pulpa rosada, epidermis lisa y amarilla al madurar. Peso del fruto mayor a 250g, fruto firme. Principalmente para la industria.
RER	Cerro colorado, Michoacán.	Fruto de pulpa blanca, epidermis chapeada al madurar. Peso del fruto menor de 150g, firme.

### 5.2.2 Injertación

El material utilizado para injertar fue propagado *in vitro*, tanto los portainjertos como los genotipos a injertar, y fueron aclimatados en un invernadero. Los injertos se hicieron en el invernadero una vez que las plantas del patrón y del injerto alcanzaron un diámetro de aproximadamente 1 cm. Se hicieron dos tipos de injertos: aproximación y púa invertida. Después de seis meses de injertar se hicieron los estudios bioquímicos y fitoquímicos correspondientes. Se tomaron fragmentos de 0.5 cm de tallo, a 1 cm por arriba y por debajo del punto de unión de los injertos y fragmentos de 0.5 cm en el punto de unión de los injertos

(Figura 5.1). Como testigo se evaluaron árboles sin injertar, en los que se tomaron muestras en las mismas posiciones como en los materiales injertados.



**Figura 5.1** Esquema de las zonas de toma de muestra en los injertos. A= Injerto de púa invertida, B= Injerto de aproximación de 'Enana roja cubana' sobre Cass.

### 5.2.3 Cuantificación de azúcares solubles totales

Los azúcares solubles totales se determinaron de acuerdo al método de Antrona (Montreuil et al. 1997) con algunas modificaciones. Por cada tipo de injerto se analizaron tres plantas y una planta por cada testigo, Se tomaron muestras de tres injertos de aproximación, tres injertos de púa invertida, y un árbol testigo. Por cada planta se colectaron de cada sección descrita en figura 1, cinco muestras de aproximadamente 0.5 cm cada una, para hacer un total de 15 muestras por planta. . Para los extractos de los tejidos se hicieron cuatro extracciones sucesivas con 3 mL de etanol al 80% en baño maría con temperatura de 80°C, los extractos obtenidos se colocaron a sequedad en una estufa a 60°C, se re-suspendieron en 1 mL de agua destilada. Para el ensayo se agregaron 3 mL de reactivo de antrona, adicionando 300 µL de extracto y 300 µL de agua destilada, la mezcla se colocó en hielo en un agitador orbital

(Daigger®) constante a 180 rpm durante 5 minutos, para después transferir los tubos a baño maría por 10 minutos. Antes de la lectura los extractos se colocaron nuevamente en hielo por 5 minutos. Las lecturas de absorbancia a 625 nm se realizaron en un espectrofotómetro UV-visible (Evolution 300, Thermo). El contenido de azúcares se expresó en  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de materia seca.

#### **5.2.4 Glucosa, fructosa y sacarosa**

La cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa se realizó a partir de los extractos usados en la cuantificación de azúcares solubles totales, y se realizó enzimáticamente por la adición secuencial de hexocinasa, fosfoglucoisomerasa e invertasa de acuerdo al método de Scholes et al. (1994). Para los ensayos se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de amortiguador HEPES 100 mM (pH 7.5), 10  $\mu\text{L}$  de NAD 40 mM, 10  $\mu\text{L}$  de ATP 100 mM (pH 7), 10  $\mu\text{L}$  de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y 10  $\mu\text{L}$  de extracto. Para determinar glucosa se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de hexocinasa (0.05 U por 1  $\mu\text{L}$  de amortiguador HEPES) y se dejó actuar durante 20 minutos antes de hacer la lectura. La fructosa se determinó agregando 10  $\mu\text{L}$  de fosfoglucoisomerasa (0.06 U por 1  $\mu\text{L}$  de amortiguador HEPES) y a los 20 minutos se registró la lectura. Por último la determinación de sacarosa se hizo adicionando 10  $\mu\text{L}$  de invertasa (0.8 U por 1  $\mu\text{L}$  de amortiguador HEPES) y se dejó 20 minutos a temperatura ambiente antes de hacer la lectura. Las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro lector de microplacas (Varioskan Flash, Thermo Scientific) a una absorbancia de 340 nm. Los cálculos se realizaron mediante curvas estándares de calibración preparadas previamente para cada uno de los azúcares y se expresaron en  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de materia seca.

### **5.2.5 Determinación de Compuestos fenólicos totales**

La determinación se hizo por medio de la reacción oxido-reducción de Folin-Ciocalteu (Nielsen 1988). La colecta de las muestras se hizo de la misma forma que para el análisis de cuantificación de azúcares. Las muestras se molieron en mortero y se maceraron con 1.5 mL de etanol al 95 % por 24 horas a -20°C. Después se centrifugaron a 16 060 g durante 10 minutos. Se tomaron 50 µL de extracto diluido, se le adicionó 450 µL de agua destilada, 250 µL de reactivo Folín al 50%, y se dejó reposar durante 8 minutos, posteriormente se agregó 1.25 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 5%, se dejó reposar nuevamente por 30 minutos. Por cada extracto se realizaron dos replicas, la reacción se hizo en oscuridad. Las lecturas a una absorbancia de 725 nm se realizaron en un espectrofotómetro UV-Visible (Evolution 300, Thermo Scientific). Los resultados se expresaron en g·100g<sup>-1</sup> de materia seca.

### **5.2.6 Descripción de los tratamientos**

Se usaron tres genotipos diferentes que se injertaron sobre dos portainjertos, dando como resultado 6 combinaciones, que se probaron con dos tipos de injertos (púa invertida y aproximación) en total fueron 12 tratamientos (Cuadro 5.2). Y como testigos se evaluaron plantas sin injertar.

**Cuadro 5.2** Descripción de los tratamientos evaluados en el análisis bioquímico y fitoquímico

Tratamiento	Vareta	Portainjerto	Tipo de injerto
<b>1</b>	Pm 12	Nayarit	Púa invertida
			Aproximación
<b>2</b>	Enana Roja Cubana	Nayarit	Púa invertida
			Aproximación
<b>3</b>	RER	Nayarit	Púa invertida
			Aproximación
<b>4</b>	Pm 12	Cass	Púa invertida
			Aproximación
<b>5</b>	Enana Roja Cubana	Cass	Púa invertida
			Aproximación
<b>6</b>	RER	Cass	Púa invertida
			Aproximación

### 5.2.7 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y para la separación de medias se utilizó la prueba de Tukey. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico Statistical Analysis System (SAS), versión 9.

### 5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo al análisis de varianza se encontraron diferencias significativas. En la prueba de medias cada una de las combinaciones de injertos (vareta/portainjerto), y en cada variable evaluada, se encontraron diferencias significativas (Cuadro 5.3). La mayor concentración de azúcares solubles totales se obtuvo en la combinación RER/Nayarit y la concentración más baja en la combinación RER/Cass, en comparación con los testigos, el portainjerto Cass fue el que mayor concentración de azúcares solubles registro ( $3.98 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ), sin embargo, cuando este se injerta se registra menor concentración de azúcares ( $2.21\text{-}1.29 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ), lo que sugiere que hay escaso movimiento de los azúcares (translocación) de la vareta al patrón. Las células que realizan fotosíntesis se encuentran en su mayoría en las hojas, capturan la energía de la luz solar con la que elaboran moléculas para su propio uso, el proceso por el cual los productos de la fotosíntesis son transportados a otros tejidos de la planta se conoce como translocación, este proceso tiene lugar en el floema y sigue un patrón de "fuente a destino", de acuerdo con la hipótesis de la corriente por presión, los azúcares ingresan en los tubos cribosos de la hoja por transporte activo y salen a otras partes del cuerpo de la planta, donde se les necesita para crecer y obtener energía, el agua se mueve hacia el interior y hacia el exterior de los tubos cribosos por ósmosis, siguiendo a las moléculas de azúcar (Curtis et al. 2008).

En lo que respecta a la concentración de los azúcares analizados, la sacarosa es el tipo de azúcar que se acumuló más, tanto en las diferentes combinaciones como en los testigos. La sacarosa desempeña un papel importante como fuente de carbono y energía para los tejidos no fotosintéticos, además, se considera fundamental para el metabolismo de la planta (Park

et al. 2009), y es metabolizado para formar azúcares simples como glucosa y fructosa (Martínez-Barajas et al. 2003).

El análisis del contenido de fenoles totales reveló que la mayor se obtuvo en los testigos Cass y Nayarit (portainjertos), y en las combinaciones de injertos la mayor concentración se observó en 'Enana roja cubana'/Nayarit. Mientras que en las combinaciones injertadas sobre Cass, las concentraciones de compuestos fenólicos fueron bajas (poner el rango). La presencia de fenoles es una característica de todos los tejidos vegetales, producto del metabolismo secundario de las plantas (Piñol et al. 2008), son compuestos solubles en agua porque la mayoría de las veces se encuentran unidos a azúcares y normalmente se localizan en vacuolas (Valencia, 1995).

**Cuadro 5.3** Comparación de medias de la concentración de azúcares y compuestos fenólicos totales en las diferentes combinaciones de injertos.

Tratamientos	Azúcares solubles totales (g·100g <sup>-1</sup> )	Glucosa (g·100g <sup>-1</sup> )	Fructosa (g·100g <sup>-1</sup> )	Sacarosa (g·100g <sup>-1</sup> )	Fenoles Totales (g·100g <sup>-1</sup> )
<b>Pm12/ Nayarit</b>	1.55 ef	0.035 ab	0.25 ab	0.36 bcde	0.96 cde
<b>Enana roja cubana /Nayarit</b>	2.11 bcde	0.033 abc	0.24 ab	0.48 abc	1.03 cd
<b>RER/Nayarit</b>	2.67 bc	0.038 ab	0.26 a	0.34 cde	0.69 f
<b>Pm12 /Cass</b>	1.47 ef	0.017 de	0.10 de	0.11 g	0.66 f
<b>Enana roja cubana /Cass</b>	2.21 bcd	0.028 bcd	0.19 bc	0.45 abcd	0.81 def
<b>RER/Cass</b>	1.29 f	0.037 ab	0.29 a	0.52 ab	0.74 ef
<b>Testigos</b>					
<b>Nayarit</b>	1.54 ef	0.030 abc	0.19 bc	0.17 gf	1.39 b
<b>Cass</b>	3.98 a	0.047 a	0.16 cd	0.55 a	2.19 a
<b>Pm12</b>	2.04 cde	0.01 de	0.13 cde	0.29 def	0.83 def
<b>Enana roja cubana</b>	2.73 b	0.011 e	0.08 e	0.27efg	1.14 c
<b>RER</b>	1.66 def	0.019 cde	0.14 cde	0.32 cde	0.39 g
<b>DSH</b>	0.66	0.01	0.06	0.16	0.23

Valores con la misma letra dentro de la misma columna entre tratamientos no presentan diferencias significativas (Tukey  $\alpha=0.05$ ); DSH= Diferencia Significativa Honesta.

En el Cuadro 5.4 se muestran los resultados de las comparaciones de medias para cada una de las variables evaluadas en los dos tipos de injertos usados (púa invertida y aproximación) y los testigos (plantas sin injertar), donde se incluyen todas las combinaciones de injertos utilizadas y se dividen por tipo de injerto. Se observaron diferencias significativas para todas las variables, la mayor acumulación de azúcares solubles totales se obtuvo en las plantas sin injertar, seguido del injerto de púa invertida, lo que se vio reflejado en el crecimiento, ya que los injertos de púa invertida fueron plantas vigorosas, con abundantes hojas en el dosel, y tallos gruesos. Árboles con doseles más pequeños tienden a producir menos madera y menor cantidad de carbohidratos en comparación con los doseles más grandes (Canham et al. 1999). El azúcar que se acumula en mayor concentración es la sacarosa, tanto en el injerto de púa invertida como en el de aproximación. En cuanto a los compuestos fenólicos, la mayor acumulación se observó en los testigos, seguido del injerto de aproximación. Esto se debe a que la herida que se hizo al momento de realizar el injerto fue mayor, en comparación con el injerto de púa invertida, ya que es una reacción normal la formación de estos compuestos, ya que los compuestos fenólicos desempeñan un papel importante en la protección de la planta frente a los depredadores, además de ayudar a curar heridas en las plantas (Piñol et al. 2008). Canessa y Castro (2008) mencionan que el tipo de injerto influye en la compatibilidad de los injertos, de acuerdo a los resultados que encontraron en pistacho.

**Cuadro 5.4** Comparaciones de medias de la concentración de azúcares y compuestos fenólicos totales en los dos tipos de injertos, donde se incluyen todas las combinaciones de injertos y sus testigos.

Tipo de Injerto	Azúcares	Glucosa (g·100g <sup>-1</sup> )	Fructosa (g·100g <sup>-1</sup> )	Sacarosa (g·100g <sup>-1</sup> )	Fenoles
	solubles totales (g·100g <sup>-1</sup> )				Totales (g·100g <sup>-1</sup> )
<b>Púa Invertida</b>	2.00 b	0.031 a	0.22 a	0.38 a	0.79 b
<b>Aproximación</b>	1.83 b	0.033 a	0.23 a	0.38 a	0.85 b
<b>Sin injertar</b>	2.39 a	0.025 b	0.14 b	0.32 b	1.19 a
<b>DSH</b>	0.21	0.004	0.02	0.05	0.07

Valores con la misma letra dentro de la misma columna no presenta diferencias significativas (Tukey  $\alpha=0.05$ ); DSH= Diferencia Significativa Honesta.

En relación a las secciones evaluadas (debajo del punto de unión, punto de unión y arriba del punto de unión), donde se incluyen todas las combinaciones de injertos y los tipos de injertos, se obtuvieron diferencias significativas en cada una de las variables evaluadas. La mayor concentración de azúcares solubles se registró en el punto de unión, y fue la sacarosa el azúcar que en mayor concentración se acumuló. Al respecto Ciobotari et al. (2010) señalan que en injertos de pera de diferentes cultivares, la acumulación de azúcares solubles fue mayor en el punto de unión (0.052 g·100g<sup>-1</sup>), y tuvo concentraciones menores por debajo del punto de unión (0.041 g·100g<sup>-1</sup>), y por arriba del punto de unión (0.032 g·100g<sup>-1</sup>). Por otro lado, Olmstead et al. (2010) mencionan que la mayor concentración de azúcares solubles en injertos de cerezo se acumula en el punto de unión y por arriba de este, lo cual podría ser una característica entre injertos compatibles e incompatibles, ya que una demanda menor de

carbohidratos por el portainjerto, contribuye a niveles más altos por arriba del punto de unión, lo cual podría reflejarse en el crecimiento vegetativo y reproductivo.

Con relación a los compuestos fenólicos la concentración fue mayor por arriba del punto de unión (Cuadro 5.5). Usenik et al. 2006 mencionan que la acumulación de catequinas por encima de la unión del injerto resulta en incompatibilidad, lo cual está relacionado con la actividad de las peroxidases (Feucht 1998) y la actividad de la auxina AIA (Feucht y Treutter 1995), que están involucradas en procesos de diferenciación vascular. En pera injertado sobre membrillo se sabe que diferentes compuestos (catequina, la procianidina B1, la arbutina y varios flavonoles) fueron los causantes de incompatibilidad (Hudina et al. 2014). En el punto de unión se detectaron concentraciones bajas de fenoles en comparación con *Prunus armenica*, en donde la acumulación de algunos compuestos fenólicos están relacionados con problemas en la diferenciación del callo y con la desorganización a nivel celular en el punto de unión, que se asocia generalmente con incompatibilidad (Errea et al. 1994, 2001). Dado que en nuestra investigación se hizo solo una cuantificación de compuestos fenólicos totales, no es posible asegurar algún tipo de incompatibilidad en cualquiera de las combinaciones de injertos, sino solo las respuestas fisiológicas que tuvieron los tratamientos.

**Cuadro 5.5** Comparaciones de medias de la concentración de azúcares y compuestos fenólicos totales en cada una de las secciones evaluadas, donde se incluyen todas las combinaciones de injertos y sus testigos.

Sección	Azúcares				Fenoles totales (g·100g <sup>-1</sup> )
	solubles totales (g·100g <sup>-1</sup> )	Glucosa (g·100g <sup>-1</sup> )	Fructosa (g·100g <sup>-1</sup> )	Sacarosa (g·100g <sup>-1</sup> )	
<b>Debajo del punto de unión</b>	1.83 b	0.028 b	0.21 a	0.35 a	0.75 b
<b>Punto de unión</b>	2.18 a	0.031 ab	0.21 a	0.39 a	0.78 b
<b>Arriba del punto de unión</b>	1.92 b	0.034 a	0.22 a	0.38 a	1.08 a
<b>DSH</b>	0.18	0.004	0.01	0.04	0.06

Valores con la misma letra dentro de la misma columna no presenta diferencias significativas (Tukey  $\alpha= 0.05$ ); DSH= Diferencia Significativa Honesta.

La detección oportuna de compatibilidad o incompatibilidad de los injertos, es considerado un proceso complejo, que involucra uno o diferentes aspectos anatómicos, bioquímicos y fisiológicos, en algunas especies ya se tiene descrito el factor o factores que están involucrados en la compatibilidad o incompatibilidad. Algunos de estos factores se asocian con la diferenciación del callo formado en el punto de unión, o interacciones metabólicas, y una formación de una zona necrótica en la unión del injerto. Sin embargo, es importante realizar más estudios que nos permitan una selección temprana de portainjertos, antes de que se observe algún síntoma de incompatibilidad externo.

En esta investigación se realizó un estudio de compuestos químicos para aportar conocimiento sobre la posible respuesta de compatibilidad de dos diferentes portainjertos, injertados sobre diferentes selecciones de guayabo, donde se concluye que de acuerdo con los resultados obtenidos con la distribución y concentración de azucares solubles y

compuestos fenólicos totales los portainjertos Cass y Nayarit presentan compatibles con las diferentes selecciones de guayabo evaluadas, esto se debe a que taxonómicamente son muy cercanas ya que pertenecen al mismo género e incluso en el caso de Nayarit son de la misma especie. En lo que respecta al tipo de injerto, el desarrollo y crecimiento visual fue mejor en plantas donde se utilizó el injerto de púa invertida. Es importante señalar que en guayabo no existen estudios previos de compatibilidad por lo que este estudio debe ser considerado como pionero que sirva de base para futuras investigaciones, ya que el uso de portainjertos ayudaría a resolver algunos de los problemas existentes en el cultivo, como son el ataque causado por nematodos y la fertilidad de suelos.

#### 5.4 LITERATURA CITADA

- Avelar M J, Téliz O D, Zavaleta M E (2001) Patógenos asociados con el “declinamiento del guayabo”. *Revista mexicana de Fitopatología* 19(2): 223-229.
- Bocantes AA, Mora NE (2010) Evaluación de cuatros patrones para injertos de guayaba (*Psidium guajava* L.). *Agronomía Mesoamericana* 21(1): 103-111.
- Canessa FD, Castro V M (2008) Evaluación de diferentes tipos de injertos en pistacho (*Pistacia vera* L.), utilizando las variedades Peters, Kerman y Aegina sobre *pistacia terebinthus* en tres épocas del año. *Simiente* 78: 1-8.
- Canham CD, Kobe RK, Latty EF, Chazdon RL (1999) Interspecific and intraspecific variation in tree seedling survival, effects of allocation to roots versus carbohydrate reserves. *Oecologia (Heidelb)* 121:1–11.
- Ciobotari G, Brianza M, Morariu A, Gradinariu G (2010) Graft incompatibility influence on assimilating pigments and soluble sugars amount of some pear (*Pyrus sativa*) Cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanic Cluj* 38(1):187-192.
- Curtis H, Barnes S, Schnek A, Massarini A (2008) *Biología*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Domínguez AJL, Aguilar SG, Nieto AD, Legaria SJP, Pineda PJ (2010) Utility of RAPD DNA Markers in the Selection og Grafts of the Mexican Guava Cultivar ‘Media China’ without Symotoms of Deficiency for Iron and Zinc. *Acta Horticulturae*. 849: 203-210.
- Errea P, Felipe A, Herrero M (1994) Graft establishment between compatible and incompatible *Prunus* spp. *Journal of Experimental Botany* 45, 393–401.
- Errea P, Garay L, Marin JA (2001) Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*) using *in vitro* techniques. *Physiology Plant* 112:135–141.

- Feucht W (1988) Graft incompatibility of tree crops: an overview of the present scientific status. *Acta Hort* 227: 33–41.
- Feucht W, Treutter D (1995) Catechin effects on growth related processes in cultivated calli of *Prunus avium*. *Gartenbauwissenschaft* 60 (1): 7–11.
- Hassimotto NM, Genovese MI, Lajolo F M (2005) Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 2928–2935.
- Hayes WB (1960) The guava and it's relatives. *Fruit growing in India 3<sup>ra</sup> Edition*, Kitabistan, AllaHabad, India. pp. 283-299.
- Hudina M, Orazem P, Jakopic J, Stampar F (2014) The phenolic content and its involvement in the graft incompatibility process of various pear rootstocks (*Pyrus communis* L.). *Journa Plant Physiology* 171: 76– 84.
- Joseph B, Priya R (2011) Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of Guava (*Psidium guajava* Linn). *International Journal of Pharma Bio Science*, 2(1), 53–69.
- Le HT, Hancock JF, Trinh TT (1998) The fruit crop of Vietnam: introduced species and their native relatives. *Fruit Varieties Journal*. 52:158-168.
- Manica I (2000) Taxonomía a goiabeira. In: Manica I (ed) *Fruticultura y tropical, goiaba*. Porto Alegre, Brazil. pp 23-36.
- Martínez-Barajas F (2003) Análisis de la acumulación de azúcares en pericarpios de dos genotipos silvestres de jitomate (*Lycopersicum esculentum*). *Agrociencia* 37:363-370.

- Olmstead MA, Lang SN, Lang GA (2010) Carbohydrate profiles in the graft union of young sweet cherry trees grown on dwarfing and vigorous rootstocks. *Scientia Horticulturae* 124:78–82.j
- Padilla RJS, González GE, Esquivel VF, Mercado SE, Hernández DS, Mayer PN (2002) Caracterización del germoplasma sobresaliente de guayabo de la región Calvillo-Cañones, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25(4): 393-399.
- Park JY, Canam T, Kang KY, Unda F, Mansfield S (2009) Sucrose phosphate synthase expression influences poplar phenology. *Tree Physiology* 29:937-946.
- Piñol MT, Palazón J, Cusidó RM (2008) Introducción al metabolismo secundario. In: Azcón-Bieto J, Talón M (eds) *Fundamentos de Fisiología Vegetal*, Segunda edición. España. pp 323-348.
- Popenoe W (1974) *Manual of Tropical and Subtropical Fruits: excluding the banana, coconut, pineapple, citrus fruits, olive and fig*. Hafner Press. New York, USA.
- Usenik V, Krs̃ka B, Vic̃an M, S̃tampar F (2006) Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca* L.) using phenol analyses. *Scientia Horticulturae* 109: 332–338.
- Valencia OC (1995) *Fundamentos de Fitoquímica*. Trillas. México

## CONCLUSIONES GENERALES

Con base en el análisis y la discusión de cada uno de los capítulos de esta investigación, se concluye lo siguiente:

Dado que los portainjertos son propagados *in vitro*, fue importante optimizar la metodología de la etapa de enraizamiento *in vitro*. El uso de AIB en concentraciones adecuadas durante esta etapa es importante para acelerar el enraizamiento en ambos portainjertos, así como obtener un mejor porcentaje del mismo. Además el estudio anatómico permitió observar que existe una conexión entre el tallo y la raíz, lo cual no generara problemas en un futuro.

Los análisis anatómico y bioquímico realizados permitieron determinar la compatibilidad de diferentes combinaciones de injertos.

Las variables anatómicas evaluadas (xilema secundario) permitieron determinar la compatibilidad anatómica entre los portainjertos y la variedad 'Enana roja cubana', en ambas combinaciones se observó continuidad y diferenciación en los tejidos.

La concentración de azúcares solubles no representó un problema para el desarrollo y prendimiento de las diferentes combinaciones de injertos, en su mayoría se acumularon por arriba del punto de unión. La sacarosa fue el azúcar que se acumuló en mayor concentración.

Los compuestos fenólicos no representan un problema de compatibilidad, ya que la concentración no afectó el prendimiento de los injertos y desarrollo durante los primeros 6 meses.

Respecto al tipo de injerto, los injertos en los que se observó un mayor crecimiento fue en los de púa invertida, aproximación fue el injerto donde mayor concentración de compuestos fenólicos hubo en el punto de unión, sin embargo, su prendimiento no se vio afectado.

El uso de portainjertos en el cultivo de guayabo es una opción viable para resolver algunos de los problemas existentes como son el ataque causado por nematodos y la fertilidad de suelos.

La detección temprana de compatibilidad de injertos es importante ya que permite conocer la afinidad entre el portainjerto y la vareta en menor tiempo. En herbáceas se han realizado varios estudios, sin embargo en plantas leñosas la información es más escasa dado que su crecimiento y desarrollo es más lento, sobre todo en el caso del cultivo de guayabo donde el uso de portainjertos a nivel comercial es nulo, por lo que este estudio debe ser considerado base para futuras investigaciones.