

**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

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

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**FRUTICULTURA**

**DIVERSIDAD GENÉTICA Y PROPAGACIÓN *in vitro* DE SELECCIONES DE GUAYABO EN MÉXICO**

**LUIS ANTONIO DOMÍNGUEZ PERALES**

**T E S I S**  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

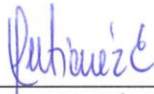

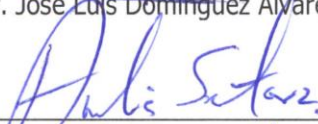

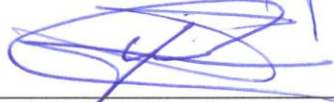
**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

2016

La presente tesis, titulada: **DIVERSIDAD GENÉTICA Y PROPAGACIÓN *in vitro* DE SELECCIONES DE GUAYABO EN MÉXICO**, realizada por el alumno: **Luis Antonio Domínguez Perales**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

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

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO	 _____ Dra. Ma. Alejandra Gutiérrez Espinosa
ASESOR	 _____ Dr. José Luis Domínguez Álvarez
ASESOR	 _____ Dr. Amalio Santacruz Varela
ASESOR	 _____ Dr. Serafín Cruz Izquierdo
ASESOR	 _____ Dr. José Saúl Padilla Ramírez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Mayo de 2016

# **DIVERSIDAD GENÉTICA Y PROPAGACIÓN *in vitro* DE SELECCIONES DE GUAYABO EN MÉXICO**

**Luis Antonio Domínguez Perales, Dr.**

**Colegio de Postgraduados, 2016**

## **RESUMEN GENERAL**

La guayaba es un fruto de origen tropical importante desde el punto de vista nutricional como una excelente fuente de vitamina C y antioxidantes, útiles en la nutrición y prevención de enfermedades; sin embargo, en México, a pesar de ser una fruta que se ha cultivado durante más de un siglo no se ha aprovechado del todo la amplia diversidad genética existente. Los escasos programas de mejoramiento en el país y la falta de variedades mejoradas que se cultiven extensamente, han abierto la posibilidad a las técnicas biotecnológicas, en particular las concernientes al cultivo de tejidos y el mejoramiento asistido por marcadores moleculares como vías alternativas que puedan complementar los métodos convencionales de propagación y de mejoramiento. Por lo que la presente investigación se planteó los objetivos de estimar la diversidad genética de 16 selecciones de guayabo con potencial productivo así como de cuatro parientes silvestres mediante con el uso de 18 *loci* de microsátelites, además de desarrollar un protocolo de regeneración *in vitro* a partir de yemas vegetativas de cinco genotipos con alto potencial comercial. El análisis de diversidad genética detectó un total de 139 alelos con un promedio de 7.66 alelos por locus y un 100 % de loci polimórficos, siendo la especie de *Psidium sartorianum* la que presentó el índice polimórfico más alto. Además, se observó que un 36.71 % de la diversidad es intraespecífica y un 63.29 % interespecífica. En la propagación *in vitro* de los cinco genotipos evaluados (Paluma 12, Paluma 6, 17-06, Roja Exterior Redonda y Roja Chapeda Grande), presentaron problemas de fenolización, por lo que se evaluó la adición de polivinilpirrolidona (PVPP) en el medio como agente antioxidante, lo que redujo los problemas de oxidación hasta en 90 y 100 % en genotipos como el RER y Chapeda Redonda Grande. La adición al medio de cultivo en la etapa de multiplicación de sulfato de adenina y adenina tuvo un efecto positivo para los diferentes genotipos, al aumentar su coeficiente de multiplicación así como el tamaño de los brotes. El enraizamiento se indujo satisfactoriamente mediante la incubación de los brotes durante 24 horas en medio MS suplementado con auxinas (AIA y AIB).

**Palabras clave:** *Psidium guajava* L, variabilidad, microsatélites, organogénesis, cultivo de tejidos.

**GENETIC DIVERSITY AND *in vitro* PROPAGATION OF GUAVA SELECTIONS  
IN MEXICO**

**Luis Antonio Dominguez Perales, Dr.**

**Colegio de Postgraduados, 2016**

**GENERAL ABSTRACT**

Guava is a fruit of tropical origin important from the nutritional point of view as an excellent source of vitamin C and antioxidants, useful in nutrition and disease prevention; however, in Mexico, despite being a fruit that has been cultivated for more than a century it has not taken full advantage of the broad genetic diversity. The few breeding programs in the country and the lack of improved varieties that are grown extensively, have opened the possibility to biotechnological techniques, in particular concerning tissue culture and improvement assisted by molecular markers as alternative ways that can complement the conventional methods of propagation and breeding. So this research objectives to estimate the genetic diversity of 16 selections of guava with productive potential as well as four wild relatives by using 18 microsatellite loci was raised, and develop a protocol for *in vitro* regeneration from vegetative buds five genotypes with high commercial potential. The analysis of genetic diversity detected a total of 139 alleles with an average of 7.66 alleles per locus and 100% of polymorphic loci, being *sartorianum* *Psidium* species which present the highest polymorphic index. Also it observed a 36.71% of diversity is intraspecific and interspecific 63.29%. In the *in vitro* propagation of the five genotypes (Paluma 12, Paluma 6, 17-06, Roja Exterior Redonda and Chapeada Redonda Grande), presented problems Phenolization, so the addition of polyvinylpyrrolidone (PVPP) was evaluated in the middle as an antioxidant, reducing the problems of oxidation up to 90 and 100% in genotypes as the RER and Chapeda Redonda Grande. Adding to the culture medium in the multiplication stage adenine sulfate and adenine had a positive effect for different genotypes, to increase its multiplication factor and the size of sprouts. Rooting was induced successfully by incubating outbreaks for 24 hours in MS medium supplemented with auxin (IAA and IBA).

## **DEDICATORIA**

A mi esposa Blanca Berenice por su apoyo, compañía y amor incondicional, además por la dicha de próximamente ser padre

A mis padres José Luis y Blanca Margarita, por su apoyo incondicional de toda la vida

A mi hermano Daniel por amistad y todo lo que hemos vivido juntos.

A todos mis amigos, Vany, Javier, Gaby, Jonás, Ángel.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darme la oportunidad y fuerza para concluir uno más de mis objetivos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme el apoyo económico para concluir mis estudios de Doctorado.

A la Subdirección de Investigación de la Universidad Autónoma Chapingo, por ayudar con el financiamiento de mi investigación.

A los integrantes de mi Consejo Particular: En especial al Dr. José Luis Domínguez Álvarez por su asesoramiento y esfuerzo para el financiamiento de la investigación. Al Dr. Amalio Santacruz Varela por permitirme el uso del laboratorio de Marcadores Moleculares y material para la realización de los experimentos. Al Dr. Serafín Cruz Izquierdo por su asesorías.

Agradezco a todos los docentes, investigadores y personal de apoyo por sus conocimientos y ayuda durante mi formación académica.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN GENERAL</b> .....	iii
<b>GENERAL ABSTRAC</b> .....	iv
<b>DEDICATORIA</b> .....	v
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	vi
<b>INDICE DE CUADROS</b> .....	x
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	12
1. Objetivos generales.....	4
2. Objetivos particulares .....	4
3. Hipótesis .....	4
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	5
1.2 Producción nacional y mundial.....	5
1.3 Métodos de propagación .....	6
1.4 Cultivo de tejidos .....	7
1.4.1 Totipotencia.....	7
1.5 Micropropagación o propagación <i>in vitro</i> .....	8
1.5.1 Morfogénesis <i>in vitro</i> .....	8
1.5.1.1 Embriogénesis .....	8
1.5.1.2 Organogénesis .....	9
1.6 Factores que controlan la organogénesis. ....	10
1.6.1 Genotipo .....	10

1.6.2 Explante.....	10
1.6.3 Condiciones físicas.....	11
1.6.4 Temperatura .....	11
1.6.5 Humedad relativa .....	12
1.6.6 La luz.....	12
1.6.7 Condiciones químicas .....	12
1.7 Propagación <i>in vitro</i> de guayabo .....	16
1.7.1 Organogénesis <i>in vitro</i> en guayabo .....	16
1.7.2 Problemas de la propagación <i>in vitro</i> de guayabo.....	18
1.8 Marcadores de ADN como herramienta de análisis de la diversidad .....	18
1.8.1 Diversidad Genética .....	18
1.8.2 Análisis de la diversidad genética .....	19
1.8.3 Marcadores Moleculares .....	21
1.8.4 Microsatélites (SSR) .....	22
1.8.5 Reacción en cadena de la polimerasa.....	23
1.9.1 Identificación de genotipos y pureza varietal.....	25
1.9.3 Selección asistida por marcadores moleculares .....	26
1.9.4 Mapeo comparativo.....	26
1.9.5 Clonado posicional.....	27
1.9.6 Estimación del flujo génico.....	27
1.9.7 Filogenia.....	27
1.10 Variabilidad genética del guayabo.....	28
1.10.1 Análisis de la diversidad genética en guayabo.....	28
1.11 Mejoramiento genético en guayabo .....	30
1.12 Bibliografía .....	32
<b>CAPITULO I. PROPAGACIÓN <i>in vitro</i> DE SELECCIONES DE GUAYABO</b>	
<b>(<i>Psidium guajava</i> L.) .....</b>	<b>42</b>



2.1 Resumen .....	42
2.2 Summary.....	43
2.3 Introducción.....	44
2.5 Resultados y Discusión.....	49
2.6 Conclusiones.....	58
2.7 Bibliografía.....	59
<b>CAPITULO II. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENETICA DE SELECCIONES DE GUAYABO Y PARIENTES SILVESTRES DEL GENERO Psidium MEDIANTE MICROSATÉLITES.....</b>	<b>69</b>
3.1 RESUMEN .....	69
3.2 Introducción.....	70
3.3 Materiales y Métodos .....	71
3.4 Resultados y Discusión.....	75
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>88</b>

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1	Efecto promedio de la concentración de bencilaminopurina en la multiplicación <i>in vitro</i> de brotes de guayabo de los genotipos Chapeada Roja Grande, PM 12 y PM6, 30 días después de aplicados los tratamientos.....	633
Cuadro 2.2	Efecto promedio de la concentración de adenina (A) y sulfato de adenina (S) en la multiplicación <i>in vitro</i> de brotes de guayabo de los genotipos PM6, PM12, 17-06, CH.R.G. y RER 30 días después de aplicados los tratamientos. ....	64
Cuadro 3.1	Loci de microsatélites e iniciadores utilizados para la amplificación de SSRs en genotipos de guayabo. ....	74
Cuadro 3.2	Parámetros de diversidad de 16 genotipos de <i>Psidium guajava</i> , <i>P. friedrichsthalianum</i> (cass), <i>P. sartorianum</i> , (arrayán) <i>P. cattleianum</i> (catley) y <i>P. guinnense</i> (guayabilla) con base en 18 loci de SSR. ....	77
Cuadro 3.3	Estadísticos de F calculados a partir de 18 loci de microsatélites para tres grupos de guayaba.....	79
Cuadro 3.4	Valores propios y proporción de varianza explicada de los 10 primeros componentes principales generados a partir de los 139 alelos de 18 <i>loci</i> de SSR en 163 accesiones del genero <i>Psidium</i> .....	80

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 2. 1 Porcentaje de explantes con diferentes grados de fenolización de yemas de cinco genotipos de guayabo utilizando PVPP como antioxidante, 10 días después de su establecimiento *in vitro*. .....65
- Figura 2. 2 Porcentaje de supervivencia para dos tipos de explantes de cinco genotipos de guayabo 10 días después de su establecimiento *in vitro*. .....66
- Figura 2. 3 Efecto de la concentración y tipo de auxina sobre el enraizamiento *in vitro* de cinco genotipos de guayabo, 30 días después del inicio de los tratamientos. ..66
- Figura 2. 4 Efecto del tipo y concentración de auxina sobre la cinética de enraizamiento de brotes de guayabo de los genotipos 17-06 (A y B) y PM6 (C y D).....67
- Figura 2. 5 Efecto del tipo y concentración de auxina sobre la cinética de enraizamiento de brotes de guayabo de los genotipos CH.R.G. (A y B), PM12 (C y D) y RER (E y F).....68
- Figura 3. 1 Dispersión de 21 poblaciones de *Psidium* con base en los dos primeros componentes principales, derivados de 139 alelos de 18 loci de SSR (PS: *P. sartorianum*, PF: *P. friedrichsthalianum*, PC: *P. cattleianum*, PG: *P. guinnense*, COT: cotorrera, EB: enana blanca cubana, ER: enana roja cubana, NAY: Nayarit, Chch: chapeada china, Chfi: chapeada firme, RER: roja exterior redonda, SKL: SK lisa, SKCH: SK china.....81
- Figura 3. 2 Dendrograma de 21 poblaciones de *Psidium* con base en 139 alelos de SSR, usando la distancia de Nei (1972) y el método de agrupamiento UPGMA.....82

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Las frutas y vegetales se utilizan como fuente de alimento, no sólo por su nutrición básica si no por su beneficio fisiológico adicional, debido a la presencia de bioactivos fitoquímicos como los polifenoles y carotenoides, útiles en la prevención de enfermedades (Haleem-Khan *et al.*, 2016). Gran número de plantas medicinales han sido reportadas por sus propiedades antioxidantes, los antioxidantes naturales son compuestos como los fenoles que evitan los procesos destructivos provocados por el estrés oxidativo. La guayaba (*Psidium guajava* L.) es importante desde el punto de vista nutricional, como una excelente fuente de vitamina C, niacina, riovflavina y vitamina A (Shen *et al.*, 2008) o como una fuente de antioxidantes como el ácido ascórbico, carotenoides, fenoles como el ácido elágico, quercetina, ácido gálico y flavonoides (Singh, 2005).

Los países que han prestado una mayor atención al cultivo del guayabo son Estados Unidos, India y Brasil los cuales cuentan con una mejor tecnología así como con materiales genéticos superiores (Mata y Rodríguez, 2005). En México es una fruta que se ha cultivado por más de un siglo; sin embargo, aunque se cuenta con regiones ecológicas para su cultivo no se ha aprovechado del todo la diversidad genética. Aunque a nivel nacional su producción no es muy relevante, la producción de este fruto tiene gran importancia para la región comprendida entre Calvillo, Aguascalientes y el cañón de Juchipila, Zacatecas, ya que es el modo de subsistencia para unos 4, 500 productores y que genera una importante derrama económica. En la región se han desarrollado diversos esfuerzos en los aspectos de sanidad e inocuidad para lograr incursionar en los mercados internacionales, con esto se ha logrado la certificación de diferentes empresas para exportar guayaba al mercado de Estados Unidos (PEGUAM, 2013).

La generación o introducción de nuevas variedades de guayabo para el cultivo extensivo y la producción no se ha establecido en México, ya que la variedad predominante a escala comercial es ‘Media China’ (Padilla *et al.*, 2002) , lo que a su vez ha llevado a que en los últimos años se observe una disminución en el número de hectáreas sembradas y en la producción, tendencia preocupante que se hace necesario revertir, sin embargo, la perspectiva de incursionar en nuevos mercados como el norteamericano representa una posibilidad para revertir esta situación, mediante el aprovechamiento de la gran diversidad morfológica de guayabas cultivadas, la cual se ha descrito y que actualmente el conocimiento adicional de la diversidad genética como base para el mejoramiento genético se ha convertido en una herramienta muy importante para el desarrollo de nuevas variedades con características agronómicas que beneficien a los productores tales como: altos rendimientos, características organolépticas y la resistencia a patógenos, de acuerdo con las necesidades de los mercados nacionales e internacionales (Pereira y Nachtigal, 2002; Pommer y Murakami, 2009; Valdés-Infante *et al.*, 2012).

Sin embargo el desarrollo de nuevas variedades, su reproducción acelerada y distribución, en especial de aquellas que posean frutos de color rojo o rosa, son un reto para los mejoradores. En este contexto, las técnicas biotecnológicas, y en particular aquellas concernientes al cultivo de tejidos y regeneración *in vitro* de plantas completas y el mejoramiento asistido por marcadores moleculares, constituyen las vías alternativas de propagación que pueden complementar satisfactoriamente los métodos convencionales (Pontikis, 1996) y permitir abordar con mayor efectividad los programas de mejoramiento, conservación e intercambio seguro de germoplasma (Valdés-Infante *et al.*, 2012).

El cultivo de tejidos en frutales tiene dos papeles importantes, facilitar su propagación y como vía para la generación de variabilidad genética (Hussain *et al.*, 2012). Por otro lado el desarrollo de la biología molecular ha generado múltiples marcadores

moleculares con los que construir y saturar rápidamente un mapa genético. Los marcadores dominantes como los RADP (polimorfismo de ADN amplificado al azar) y los marcadores de alta eficiencia como los AFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados) permiten el análisis de un número elevado de loci sin necesitar información previa sobre su secuencia, sin embargo los marcadores codominantes como RFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción, SSR (secuencias simples repetidas), son más informativos al permitir diferenciar las variantes alélicas de los loci analizados (Grando *et al.*, 2000). En guayabo el uso de estas técnicas biotecnológicas ha contribuido significativamente en los programas de propagación, conservación y mejoramiento; se han generado protocolos para su cultivo *in vitro*, así como mapas de ligamiento genéticos y QTLs y la detección de genes de interés (Chandra *et al.*, 2007; Biswas *et al.*, 2007; Zamir *et al.*, 2007; Rai *et al.*, 2009; Ritter *et al.*, 2010; Lepitre *et al.*, 2010).

La aplicación de la biotecnología en el cultivo del guayabo muestra un futuro promisorio (Biswas *et al.*, 2007), además, que la variedad de opciones comerciales disponibles son muy pocas, su propagación a gran escala y que no todos los genotipos de guayaba responden de la misma forma a los diferentes protocolos de micropropagación, por lo que se hace indispensable la generación de protocolos específicos para la propagación de cada genotipo. Además que el conocimiento de la variación genética mediante la caracterización fenotípica y genotípica de genotipos, así como la relación entre las poblaciones son importantes en la comprensión de dicha variabilidad y su uso en programas de mejoramiento basados en individuos y poblaciones nativas.

En contexto de lo anterior, en la presente investigación se plantean los siguientes objetivos e hipótesis:

## 1. Objetivos generales

- Desarrollar un protocolo de regeneración *in vitro* a partir de yemas vegetativas de cinco diferentes genotipos de guayabo con alto potencial comercial.
- Estimar la diversidad genética de selecciones de guayabo con potencial productivo y de cuatro parientes silvestres.

## 2. Objetivos particulares

- Evaluar dos tipos de explantes y PVPP como agente antioxidante en el establecimiento *in vitro*.
- Evaluar el efecto del uso de adenina y sulfato de adenina en la proliferación de brotes.
- Promover la rizogénesis por medio de la adición de auxinas en el medio de cultivo. diferentes tipos de explantes así como concentraciones hormonales en la multiplicación y la inducción del enraizamiento *in vitro* de brotes.
- Determinar las relaciones de similitud y filogenéticas entre las diferentes especies de *Psidium*.

## 3. Hipótesis

- Por sus características genéticas las selecciones de guayabo tienen una respuesta morfogénica diferente que depende de las concentraciones y combinaciones hormonales.
- Existe una gran diversidad genética entre las diferentes especies de *Psidium* de acuerdo con el análisis de secuencias simples repetidas de ADN.
- La variación genética entre las poblaciones de guayabo siguen patrones definidos, que permiten categorizar las poblaciones en grupos bien diferenciados.
- Se pueden identificar alelos que contribuyan significativamente a la clasificación de los diferentes tipos de guayaba.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### 1.1 Origen y distribución de la especie

El guayabo (*Psidium guajava* L.) tiene su origen en las zonas tropicales y subtropicales de América, lo que se sustenta por las más de 140 especies del género *Psidium* que se distribuyen en esta región, de ahí fue distribuido a Europa, India y Asia. México se considera como un centro principal de diversidad de especies, y puede considerarse como un cultivo nativo en todo el país (Padilla-Ramírez y González-Gaona, 2010). La guayaba cass o guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* O. Berg) crece naturalmente a través de México hasta Panamá, además de Colombia y Costa Rica. El origen de la guayaba cattley o guayaba fresa (*Psidium cattleianum* Afzel. ex Sabine) es considerado desde el oriente y sur de Brasil al noreste de Uruguay, de aquí fue distribuida a las zonas tropicales de Sudamérica, América Central y el Mediterráneo. La guayabilla o guayaba ácida (*Psidium guineense* Sw.) es originaria de las zonas tropicales y subtropicales de América, desde el norte de América y Perú hasta el sur de México (Lim, 2012). El arrayán (*Psidium sartorianum*) tiene su origen en México y Centroamérica. (Sánchez, 1990).

### 1.2 Producción nacional y mundial

México es uno de los principales productores y exportadores de guayaba y sus derivados, siendo superado en producción solo por India y Pakistán. (Pommer y Murkami, 2009).

A pesar de esto, en los últimos años la superficie plantada y la producción nacional han venido en decremento. Para 2014 la superficie plantada fue de 20, 899 ha, mientras que para el 2007 se reportaron 23, 621 ha. Los estados de Michoacán, Aguascalientes y Zacatecas los que concentran el 90 % de la superficie total cultivada, con 9 448, 6 268 y 3



040 hectáreas, con rendimientos promedio de 14.93, 15.87 y 16.40 t ha<sup>-1</sup>, respectivamente (SIAP, 2015).

### **1.3 Métodos de propagación**

La propagación del guayabo se puede realizar por dos métodos: sexual y asexual o vegetativa. No obstante, en México y otros países como Venezuela han sido establecidas plantaciones comerciales a partir de plantas propagadas por semilla, lo que ha generado una gran variabilidad dentro de estas, y ha traído dificultades como un mayor periodo de juvenilidad, heterogeneidad de plantas, variabilidad en forma y colores de fruto (Lim and Khoo, 1991; Albany *et al.*, 2004; Mishra *et al.*, 2007).

La propagación asexual puede ser por diferentes métodos como: estacas, acodos, injertos y cultivo de tejidos. La principal ventaja de estos métodos es mantener las características agronómicas de los cultivares y reducir su periodo juvenil (IIFT, 2011).

La propagación por estacas o esquejes es una forma de propagación donde los niveles de humedad son un factor importante para lograr su enraizamiento, mientras que el acodo tiene poca utilidad práctica, ya que cuando se requiere grandes cantidades de plantas el material que sirve como fuente es limitado. La utilización de injertos es una de las vías más empleadas por lo que, la obtención de material para ser injertado es de suma importancia, se recomienda coleccionar las yemas de plantas ‘donadoras’ de la misma estación de crecimiento, provenientes de brotes vegetativos vigorosos. Un problema es que las varetas de guayabo se oxidan con facilidad, por lo cual se sugiere utilizarlas el mismo día en que son obtenidas (González *et al.*, 2002). Otro tipo de propagación clonal es la utilización de células, tejidos u órganos denominado cultivo de tejidos, el cual tiene un alto potencial en especies de importancia económica. (Giri *et al.*, 2004).

## **1.4 Cultivo de tejidos**

El cultivo de tejidos puede ser definido como un conjunto de técnicas en las que un explante (protoplasto, células, tejidos u órganos) se cultivan asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuban en condiciones ambientales controladas (Mroginski *et al.*, 2004). Las condiciones controladas proporcionan al cultivo un entorno propicio para el crecimiento y multiplicación de plantas. Estas condiciones incluyen el suministro adecuado de nutrientes, el pH del medio, la temperatura y ambiente gaseoso adecuado (Hussain *et al.*, 2012).

Las bases teóricas del cultivo de tejidos en plantas fueron propuestas por Gottlieb Haberlandt en 1902. Estableció el concepto de la totipotencia, mediante sus ideas de las propiedades y la potencialidad de la célula, además de las interrelaciones y la influencia que a las que están expuestas las células en un organismo multicelular (Thorpe, 2012).

La tecnología del cultivo de tejidos a parte de su uso como una herramienta en la multiplicación de plantas a gran escala, o su uso como herramienta de investigación, las técnicas del cultivo de tejidos en los últimos años han adquirido una gran importancia en la generación de variabilidad somaclonal, la generación de dobles haploides para generar homocigosis, obtención de plantas libres de enfermedades por el cultivo de ápices, producción de compuestos industriales por cultivo celular, el desarrollo de plantas tolerantes al estrés y la conservación de especies en peligro de extinción o amenazadas (Rai *et al.*, 2010; Hussain *et al.*, 2012).

### **1.4.1 Totipotencia**

A la habilidad de poder regenerar una planta completa a partir de una célula o grupo de ellas se le conoce como totipotencia, que se define como la capacidad de las células para alterar su metabolismo, el crecimiento y desarrollo (Thorpe, 2007). Aunque todas las células son totipotentes, existe una proporción que mantienen su totipotencia que varía entre

especies y entre variedades, siendo las células meristemáticas las más capaces para expresarla (Razdan, 2003; Segura, 2008).

La definición de la totipotencia en plantas ayudo a reconocer el potencial del cultivo de tejidos en la propagación clonal (Debnath *et al.*, 2006; Thorpe, 2012).

## **1.5 Micropropagación o propagación *in vitro***

La micropropagación es una de las aplicaciones del cultivo de tejidos más usadas con fines comerciales, en la producción de plantas clonales de especies ornamentales, medicinales, algunas especies arbóreas, así como de cultivos importantes como la papa y el banano. Las técnicas de la micropropagación son teóricamente aplicables a todas las plantas, se recomienda en especies que su propagación es de manera asexual (Thorpe, 2012).

### **1.5.1 Morfogénesis *in vitro***

La morfogénesis se define como un cambio fisiológico o morfológico que permite la especialización de una célula, tejido, órgano o planta entera durante su desarrollo. Los procesos morfogénéticos que se desarrollan en condiciones de cultivo *in vitro* se clasifican en dos vías principalmente: la organogénesis y la embriogénesis somática (Ramage y Williams, 2002; Radice, 2004).

#### **1.5.1.1 Embriogénesis**

La embriogénesis se puede llevar a cabo por dos vías, la somática y la cigótica. La embriogénesis somática es el proceso mediante el cual las células somáticas se desarrollan en plantas diferenciadas pasando por las etapas características embriológicas, sin que ocurra fusión de gametos. Aunque los procesos de la embriogénesis somática y la cigótica son activados por diferentes estímulos como fitohormonas y enzimas, en ambos procesos existe la expresión de los mismos genes (Santana *et al.*, 2004; Ikeda *et al.*, 2006).

Tanto la organogénesis como la embriogénesis pueden ser iniciadas de manera directa a partir de los explantes, o indirectamente mediante el establecimiento de masas de células desorganizadas llamadas callos (Hussain *et al.*, 2012).

### **1.5.1.2 Organogénesis**

La organogénesis se refiere a la formación de tallos, raíces o flores inducidos a partir de una célula o grupo de células, que de acuerdo a las condiciones de cultivo, tienen la propiedad de mantenerse en activa división (Radice, 2004). La organogénesis puede ocurrir a partir de estructuras preexistentes como yemas vegetativas (Andreu y Marín, 2005) o de manera adventicia, con la formación de tejidos meristemáticos, los cuales son capaces de organizarse y conformar un ápice caulinar o radical (Liu y Bao, 2003; Singh *et al.*, 2004). La estimulación de la diferenciación depende de muchos factores que difieren para las diferentes especies de plantas. En general, es promovida por las citocininas e inhibida por las auxinas (Rai, 2007).

La regeneración comprende diferentes fases: adquisición de competencia, fase de inducción y fase de realización. La competencia es el potencial endógeno de una célula o tejido para desarrollarse en una vía, en esta etapa las células no responden al estímulo organogénico pero adquieren esa competencia, durante una fase de desdiferenciación. En la etapa de inducción, las células son receptivas al estímulo morfogénico y hay una dirección directa entre el tipo, concentración y combinación de reguladores de crecimiento agregados al medio de cultivo y el órgano a desarrollar. En la fase de realización, las células sufren las sucesivas divisiones para formar el órgano determinado (Radice, 2004; Che *et al.*, 2007). Las células vegetales pueden adquirir este estado de determinación mediante dos mecanismos: 1) la división desigual de una célula para generar dos células hijas que sigan destinos diferentes y 2) la comunicación intercelular, que transfiere la información necesaria

para emprender la ruta de diferenciación que depende de la posición que ocupa la célula en el órgano (Segura, 2008).

## **1.6 Factores que controlan la organogénesis.**

Existen diversos factores que afectan o regulan el proceso de morfogénesis durante el cultivo *in vitro*, los principales son: el genotipo, el explante, las condiciones químicas y las condiciones físicas (Radice, 2004).

El éxito de la micropropagación en árboles frutales y sobre todo en especies recalcitrantes, depende de factores como la calidad del explante y su respuesta que es determinada por el genotipo, el estado fisiológico de los tejidos y la época del año en que se colectan los explantes (Giri *et al.*, 2004).

### **1.6.1 Genotipo**

El genotipo es el factor más determinante en los procesos morfogénicos, ya que el material vegetal tiene la información genética que define desde la capacidad del explante para su establecimiento *in vitro* así como la diferenciación y el crecimiento de nuevos órganos. Debido a estas diferencias que se da entre especies e inclusive entre variedades, no permite que se generalicen metodologías o protocolos de trabajo (Radice, 2004).

### **1.6.2 Explante**

Para la selección de los explantes es necesario tomar en cuenta diversos factores para un efectivo establecimiento *in vitro*, entre los cuales están:

- 1) El objetivo del cultivo. En esta caso el objetivo es la obtención de plantas con sanidad controlada, es muy común la utilización de meristemos de entre 0.2 a 0.5 mm de longitud como explantes. Si por otra parte el objetivo es la micropropagación, los ápices terminales y los segmentos uninodales de ramas jóvenes constituyen excelentes explantes (Mronginski *et al.*, 2004).

- 2) Posibilidad de contaminación. Se recomienda el uso de explantes que provengan de plantas que crezcan en condiciones de invernadero, con ello se reduce sustancialmente las tasas de contaminación (Mronginski *et al.*, 2004).
- 3) Edad fisiológica. Es uno de los aspectos de gran influencia en la morfogénesis. En general se puede mencionar que cuanto más joven e indiferenciado se encuentre el explante a cultivar, mejor será su respuesta *in vitro*.
- 4) Tamaño. En cuanto de mayor tamaño sea el explante seleccionado mayor probabilidad de inducir la proliferación de callos o la regeneración directa de órganos. Sin embargo, a mayor tamaño del explante mayor la posibilidad de que se contamine (Mronginski *et al.*, 2004).
- 5) Época del año. La época del año se asocia con el grado de dormición que presentan ciertos explantes y también con la mayor o menor proliferación de microorganismos (Molina *et al.*, 2002; Mronginski *et al.*, 2004).

### **1.6.3 Condiciones físicas**

Entre las condiciones físicas se pueden mencionar los efectos de la temperatura, la humedad relativa y la luz (Radice, 2004).

### **1.6.4 Temperatura**

Si bien las condiciones naturales del cultivo las plantas tienen diferencias térmicas durante el día y la noche, las temperaturas *in vitro* se mantienen casi estables (Radice, 2004). Se ha encontrado que un rango de temperatura de  $26 \pm 3$  °C es el óptimo para el desarrollo del cultivo. Mientras que temperaturas mayores a 30 °C y por debajo de 21 °C influyen negativamente en el desarrollo (Razdan, 2003; Radice, 2004).

### **1.6.5 Humedad relativa**

La humedad relativa como medida de la cantidad de vapor agua en el atmósfera gaseosa, depende del tipo de cobertura o sello del envase empleado. Si el cierre es hermético, la humedad interior será del 100 %, si existe la posibilidad de intercambio gaseoso, la humedad interna puede descender a niveles cercanos al 50 % (Radice, 2004).

### **1.6.6 La luz**

La luz suministrada a los cultivos debe ser evaluada en cuanto a la calidad, intensidad y período de suministro. La respuesta morfogénica de un explante puede variar según se le proporcione luz o no. La luz afecta muchos procesos en el desarrollo de las plantas, incluyendo la maduración de los cloroplastos, forma de la hoja, diferenciación de órganos y la dirección del crecimiento (Radice, 2004; Reuvenil y Evenor, 2007).

### **1.6.7 Condiciones químicas**

Son varios los compuestos químicos que influyen en los patrones morfogénicos *in vitro* de los cuales se pueden considerar. El medio de cultivo se puede definir como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos para la nutrición de los cultivos y es uno de los factores que define el éxito del cultivo de tejidos. Básicamente, los medios de cultivo se componen de: una fuente de carbono, nutrientes minerales, sustancias vitamínicas, aminoácidos, reguladores de crecimiento y agente gelificante (Mroginski *et al.*, 2004; Saad y Elshahed, 2012).

- **Macronutrientes**

Los elementos esenciales en medio de cultivo incluyen además de carbono (C), hidrogeno (H) y oxígeno (O), macroelementos: nitrógeno (N), fosforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S) proveen los elementos más indispensables para un buen desarrollo y morfogénesis. El paso más importante en el manejo de un medio de cultivo

de tejidos es la selección de iones en la concentración y balance correctos (Razdan, 2003; Saad y Elshahed, 2012).

- **Micronutrientes**

Los micronutrientes esenciales para el cultivo de tejidos incluyen el hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), boro (B), cobre (Cu) y molibdeno (Mo). El Fe es por lo general el micronutriente más crítico de todos, ya que existen algunos problemas con compuestos ya que se dificulta su disolución así como tiende a precipitarse después de la preparación de los medios. Otros elementos como el cobalto (Co), yodo (I), sodio (Na) y el cloro (Cl) pueden ser añadidos a ciertos medios sin embargo no se ha demostrado su función en el crecimiento celular (Saad y Elshahed, 2012).

- **Fuente de carbono**

Prácticamente todos los cultivos *in vitro* son heterótrofos y por ende necesitan un suministro de una fuente de carbono (Mroginski *et al.*, 2004). La sacarosa en concentraciones de 2 a 5 %, es el azúcar más utilizado. Otros azúcares utilizados son lactosa, galactosa, maltosa y almidón, sin embargo, se reporta que son menos eficaces en comparación a la sacarosa o la glucosa. La sacarosa presenta la ventaja que al ser autoclaveada se hidroliza en más azúcares utilizables tales como la fructosa, además de reportarse como el iniciador morfogénico en la formación de yemas axilares y la ramificación de yemas adventicias (Saad y Elshahed, 2012).

- **Reguladores de crecimiento**

Dentro de las condiciones químicas los reguladores de crecimiento juegan un papel importante ya que son compuestos orgánicos que regulan diversos procesos en las plantas como el crecimiento y la morfogénesis (Radice, 2004; Beyl, 2010). En el cultivo *in vitro* los reguladores más utilizados son las citocininas y las auxinas, además hacemos uso de la capacidad de dirigir el crecimiento usando reguladores de crecimiento para el estimular el



desarrollo de embriones no zigóticos, crecimiento y desarrollo de callo, la proliferación de brotes axilares y el desarrollo de raíces adventicias (Beyl, 2010).

Las investigaciones de cultivo de tejidos están dirigidas para determinar el tipo y la concentración de los reguladores de crecimiento para inducir respuestas específicas. Algunas especies son muy susceptibles al cultivo de tejidos y se necesitan bajas concentraciones de las fitohormonas para obtener el resultado deseado, sin embargo, otras como las especies leñosas requieren ya sea altas concentraciones u hormonas más fuertes para obtener resultados (Beyl, 2010).

- **Auxinas**

Las auxinas en la planta están involucradas en el fototropismo y geotropismo, en la dominancia apical, en la inducción de raíces, el alargamiento celular y la respuesta a heridas. (Beyl, 2010).

Las auxinas más comúnmente usadas en el cultivo de tejidos de plantas son: ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB), ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA) (Saad y Elshahed, 2012), AIA es la única auxina natural utilizada en el cultivo de tejidos, sin embargo su uso es limitado debido a su sensibilidad a la luz y su tendencia a oxidarse en los medios ya sea metabolizada por los tejidos de la planta o degradada por microorganismos (Beyl, 2010).

La concentración de AIA en la planta está regulada por las tasas de biosíntesis, las tasas de oxidación por la enzima AIA-oxidasa, y la formación de conjugados con azúcares o aminoácidos (Beyl, 2010).

Las auxinas difieren en su actividad fisiológica y en el grado en que se translocan a través del tejido y son metabolizadas. Con base en ensayos de curvatura del tallo se observó que el 2,4-D tiene una actividad de ocho a doce veces mayor que el AIA. En cultivo de tejidos las auxinas se utilizan generalmente para estimular la producción de callos y crecimiento

celular, para inducir brotes y raíces, para inducir la embriogénesis somática y para estimular el crecimiento de los ápices de brotes (Saad y Elshaed, 2012).

- **Citocininas**

Citocinina es el nombre genérico de una serie de sustancias, naturales o sintéticas, capaces de estimular la división celular en presencia de auxinas. La primera citocinina descubierta fue la quinetina en 1956 por el grupo de Skoog y fue descubierta como resultado de la identificación de factores químicos capaces de estimular la proliferación celular en explantes de médula de tabaco cultivados *in vitro*. Desde entonces se han descubiertos más de 100 sustancias naturales y sintéticas capaces de ejercer efectos fisiológicos similares a la quinetina (Segura, 2008).

Las citocininas naturales conocidas son derivados de la base púrica adenina (6-aminopurina). Se pueden encontrar en las plantas como bases libres o formando conjugados con diversos compuestos químicos (Segura, 2008).

Las principales funciones desarrolladas por las citocininas en las plantas incluyen procesos como la división celular y la diferenciación, retrasar la senescencia, desarrollo de cloroplastos, desarrollo vascular, la iniciación y desarrollo de brotes (Beyl, 2010).

Las citocininas comúnmente utilizadas en el cultivo *in vitro* son la 6-benzilaminopurina (BAP), 6-dimetilaminopurina (2iP), quinetina, zeatina y tidiazurón (TDZ). La zeatina y el 2iP son citocininas de origen natural. En el cultivo de tejidos las citocininas demostraron estimular la división celular, inducir la formación de brotes y la proliferación de brotes axilares y para retardar la formación de raíces (Saad y Elshehed, 2012).

El rango efectivo de las citocininas amino purinas más utilizadas en el cultivo *in vitro* que BAP y quinetina es de 1 a 10  $\mu\text{M}$ , el cual ha demostrado una efectiva estimulación en

la proliferación de brotes y la formación de callo en especies herbáceas y leñosas (Beyl, 2010).

- **Giberelinas**

Las giberelinas comprenden más de 20 componentes, de los cuales el ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) es el más utilizado. Su función es estimular el crecimiento de callo y la elongación de brotes o la conversión de yemas a brotes (Saad y Elshehed, 2012). El GA<sub>3</sub> interfiere con la iniciación de yemas en las primeras etapas de formación del meristemo y, por consiguiente, puede reducir a producción de brotes *in vitro* si se suministra en la etapa temprana de iniciación de yemas de brotes. De igual manera el GA<sub>3</sub> reduce la formación de raíces y la embriogénesis *in vitro* (Aké *et al.*, 2007).

## **1.7 Propagación *in vitro* de guayabo**

### **1.7.1 Organogénesis *in vitro* en guayabo**

El cultivo de tejidos tiene un considerable potencial para el mejoramiento de árboles de importancia económica (Giri *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004). El éxito de la regeneración de plantas a través del cultivo de tejidos ofrece una excelente oportunidad para el mejoramiento genético del guayabo.

La organogénesis en guayabo, como las demás especies, está influenciada por diversos factores como el tipo de explante, los reguladores de crecimiento, la composición del medio y el ambiente donde se realiza. (Rai *et al.*, 2010). Se han llevado a cabo diversas investigaciones para determinar la mejor época para establecer el cultivo *in vitro* en guayaba, siendo para el cultivar Allahabad Safeda, la época entre abril y junio donde se obtuvo la mayor supervivencia y la mínima exudación de fenoles y contaminación de los explantes (Mishra *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2005). De igual manera se ha inducido su organogénesis

a partir de explantes de árboles maduros y a partir de plántulas (Singh *et al.*, 2002; Shah *et al.*, 2008).

El requerimiento nutrimental para un óptimo crecimiento durante el cultivo de tejidos varía con las especies, por lo que la composición de los medios de cultivo tiene un papel importante en la morfogénesis y la respuesta de los explantes. En el caso de guayabo se ha utilizado una serie de medios para el inicio del cultivo y la organogénesis (Rai *et al.*, 2010), destacándose el uso del medio MS (Murashige y Skoog, 1962). Singh *et al.*, 2002 reportaron el uso de medio MS con sales reducidas al 50 % para un mejor desarrollo de brotes del cv. Allahabad Safeda; otros estudios señalan al medio WPM para una adecuada morfogénesis (Meghwal *et al.*, 2003).

Los niveles y el tipo de reguladores de crecimiento incluidos en el medio determinan en gran medida el éxito del cultivo de tejidos. El enraizamiento y la formación de brotes están estrechamente relacionados con las concentraciones de auxina y citocinina en el medio (Rout *et al.*, 2000). El BAP es la citocinina más utilizada para la propagación de guayabo (Ali *et al.*, 2003; Meghwal *et al.*, 2003; Chandra *et al.*, 2007; Zamir *et al.*, 2007), esta superioridad del BAP para la inducción de brotes se puede atribuir a la capacidad de los tejidos de la planta para metabolizarla con mayor facilidad o la capacidad del BAP para inducir la producción de hormonas naturales como la zeatina (Malik *et al.*, 2005). Otros aditivos que tienen un efecto significativo sobre la proliferación y elongación de los brotes son el sulfato de adenina (Singh *et al.*, 2002).

La iniciación de las raíces en guayabo ha sido estimulada por la incorporación de AIB solo o en combinación con ANA (Rai *et al.*, 2010), al igual concentraciones bajas de sales en el medio son usadas para el enraizamiento de brotes. El carbón activado también es comúnmente utilizado para mejorar el crecimiento celular y la diferenciación ya sea solo o

después de una auxina que induzca el enraizamiento (Thomas y Schiefelbein 2008; Singh *et al* 2002).

### **1.7.2 Problemas de la propagación *in vitro* de guayabo.**

Los principales problemas asociados con el cultivo *in vitro* obtenido a partir de brotes de árboles maduros son el oscurecimiento del medio o de los explantes debido a la presencia de fenoles, la contaminación microbiana, y la recalcitrancia (Rai *et al.*, 2010).

La alta exudación de fenoles durante la separación de los explantes provoca su oscurecimiento y un lento desarrollo (Rai *et al.*, 2010). Para reducir la exudación de fenoles Chandra *et al.*, (2007) y Mishra *et al.*, (2007) recomiendan una suplementación de 500 mg de ácido cítrico y una incubación en oscuridad total durante 24 horas, además del uso de plántulas, ya que no tienen una alta síntesis de fenoles.

Al igual que la contaminación microbiana la recalcitrancia de tejido es otro de los mayores problemas para el cultivo cuando se usan explantes de plantas maduras (Krishna y Singh, 2007). La selección adecuada del estado de madurez de los árboles donde se obtienen los explantes es una etapa importante para superar la recalcitrancia (Benson 2000; Krishna y Singh, 2007). Los crecimientos jóvenes de la base de los tallos son una fuente confiable de ápices y segmentos nodales para el cultivo *in vitro* de guayabo (Singh *et al.*, 2004).

## **1. 8 Marcadores de ADN como herramienta de análisis de la diversidad**

### **1.8.1 Diversidad Genética**

La habilidad de las especies para poder adaptarse a los cambios del ambiente a lo largo del tiempo depende del nivel de variabilidad genética que contenga; es decir, que cuanto más diferencias existan entre los individuos, la población en conjunto tendrá más oportunidades de sobrevivir a los constantes cambios que ocurren en la naturaleza (Marcucci *et al.*, 2005). Esta diversidad se manifiesta en diferencias de la secuencia de ADN, en

características bioquímicas, en propiedades fisiológicas o en morfología (Rao y Hodgkin, 2002). La variación que se visualiza puede ser de dos tipos: una de diversidad neutral que no se ve afectada por la selección natural, sino que es consecuencia de la deriva genética y el flujo genético y es causante de las variaciones y la diversidad entre especies, la segunda es la diversidad correspondiente a los caracteres con valor adaptativo que proviene de mutaciones y recombinaciones y que genera la variación entre individuos (Jiménez y Collada, 2000; Rao y Hodgkin, 2002).

La diversidad genética en la agricultura es un elemento esencial para la supervivencia de los cultivos y la obtención de mejores productos. La reducción de esta variabilidad implica una gran vulnerabilidad para el sistema agrícola, ya que es una fuente de mecanismos de defensa contra plagas, enfermedades, cambios climáticos, entre otros factores que puedan afectar la productividad (Rao y Hodgkin, 2002).

### **1.8.2 Análisis de la diversidad genética**

Dada la importancia de la diversidad genética, su cuantificación ha sido objeto de estudio de los genetistas. En un principio las únicas diferencias observables entre individuos eran los rasgos fenotípicos, pero esta variación genética no está bien determinada, debido a que los rasgos muchas veces están regulados por varios genes, interacción entre genes, y es fácilmente influenciada por el ambiente. El desarrollo de técnicas para estudiar la diversidad a nivel molecular abrió la posibilidad de estudiar caracteres con un control genético sencillo. (Jiménez y Collada, 2000). Los estudios de variabilidad genética resultan útiles para el manejo racional del material vegetal, tanto para su conservación como para su mejoramiento (Marcucci *et al.*, 2005; Frankham *et al.*, 2003).

Existe gran variedad de métodos para determinar la clasificación de accesiones, la diversidad y la relación entre individuos (Marcucci *et al.*, 2005; Oliveira y Nacimiento, 2001). Para cuantificar de algún modo la variabilidad los marcadores bioquímicos,

incluyendo isoenzimas y los marcadores moleculares basados en ADN, han ido ganando aceptación. Los marcadores moleculares presentan ciertas ventajas sobre otro tipo de marcadores, ya que generalmente no son afectados por el ambiente (Doebley, 1994). La elección de los marcadores depende de varios factores como el tipo de herencia del marcador y en menor medida su facilidad de uso y costo (Piñero *et al.*, 2008).

Los marcadores nos dan una estimación de la diversidad genética entre cultivares y diferentes especies. Existen diversas técnicas, que ofrecen distinto tipo de información según las características de la molécula o fragmento de molécula analizado (Jiménez y Collada, 2000). Los estimadores que normalmente se utilizan para evaluar la variación genética incluyen, el número de alelos, la heterosis esperada y el polimorfismo (Gillespie, 2004; Hedrick, 2005). Estos estimadores se han desarrollado para todos los marcadores (Piñero *et al.*, 2008). De acuerdo a la teoría de genética de poblaciones la variación genética puede ser descompuesta en diferentes factores, para su análisis se han desarrollado diversos métodos que estiman la diferenciación y la estructura genética. Uno de los métodos es la estimación de la proporción de variación genética que se encuentra dentro y entre las poblaciones o conocidos como estadísticos de F de Wright (Piñero *et al.*, 2008). Estos estadísticos de F pueden ser vistos como la correlación entre genes homólogos tomados de un nivel de la subdivisión en cualquier otro nivel superior: la correlación entre los genes de los individuos y los de la población ( $F_{IT}$ ) o endogamia total, La correlación entre los genes de los individuos y los de la subpoblación ( $F_{IS}$ ) y la correlación entre los genes de la subpoblación y los de la población ( $F_{ST}$ ) (Excoffier, 2001; Piñero *et al.*, 2008).

A partir de estos datos también es posible establecer relaciones de paternidad y parentesco, relaciones filogenéticas, o analizar que procesos están ocurriendo en las poblaciones (Jiménez y Collada, 2000). Otro parámetro frecuentemente utilizado para evaluar las relaciones genéticas entre poblaciones e individuos es el cálculo de las distancias

genéticas. La medida más habitual de la distancia genética es la propuesta por Nei (1972) conocida como distancia estándar de Nei.

### **1.8.3 Marcadores Moleculares**

Los recursos fitogenéticos son reservorios de genes que son de gran utilidad en un programa de mejoramiento. Los factores como el ambiente y la herencia cuantitativa o dominancia parcial y completa a menudo confunden la expresión de un gen; sin embargo, estas complicaciones pueden ser mitigadas en su mayoría mediante la identificación directa del genotipo con un ensayo de ADN utilizando marcadores moleculares (Sharma *et al.*, 2007).

Se han llevado a cabo diferentes estrategias relacionadas con la elaboración de mapas genéticos, la segregación y la variabilidad, a partir de marcadores fenotípicos, como los empleados por Mendel en el siglo XIX. Las limitaciones evidentes de los marcadores fenotípicos dio paso a los marcadores basados en secuencias de ADN, conocidos actualmente como marcadores moleculares de ADN (Briceño *et al.*, 2010).

Con base a lo anterior, un marcador molecular se puede definir como un segmento de ADN que refleja las diferencias a nivel del genoma, que puede o no estar ligada a la expresión de un rasgo fenotípico. El análisis de los marcadores moleculares basados en ADN se basa en estas pequeñas diferencias de las secuencias, las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los diferentes tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Karp y Edwards, 1997; Azofeifa-Delgado, 2006; Agarwal *et al.*, 2008). Algunos ejemplos de ellos son: polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), microsatélites o secuencias simples



repetidas (SSR), amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites (RAMPO) (Belaj *et al.*, 2003).

Las ventajas de los marcadores es que son reproducibles y estables en todos los tejidos de un organismo, a pesar de su grado de desarrollo, diferenciación y crecimiento. Además de no ser influenciados por factores externos como el ambiente o de factores endógenos (Agarwal *et al.*, 2008).

Las principales características deseables de un marcador molecular es que debe ser polimórfico y tener una buena distribución en todo el genoma, debe ser económico, rápido, fácil de determinar, requerir cantidades mínimas de ADN y no requerir ningún conocimiento previo del genoma (Agarwal *et al.*, 2008).

#### **1.8.4 Microsatélites (SSR)**

Los microsatélites se pueden describir como pequeños segmentos de ADN, de 1 a 6 nucleótidos de largo, que se repiten al azar en “tandem” flanqueadas por secuencias de copia única en el genoma de un organismo (Picca *et al.*, 2004; Agarwal *et al.*, 2008). Una vez localizados tales fragmentos, que son frecuentes en el genoma, se secuencian las zonas que las flanquean y se construyen con ellas iniciadores que debido al fragmento repetido entre ellos, podrán aparearse en numerosos puntos del genoma; esto es, puede haber innumerables loci. Los alelos de un mismo locus son secuencias de distinto número de repeticiones del motivo repetido.

La base genética del polimorfismo detectado se basa en la variabilidad del número de repeticiones y consecuentemente del tamaño del microsatélite amplificado en individuos de una especie. Estos marcadores son codominantes, propios de un genoma específicos y altamente polimórficos (Picca *et al.*, 2004).

Los microsatélites (SSR) son una herramienta poderosa para analizar la variabilidad genética y la relación en los diferentes niveles jerárquicos, para la generación de mapas

genéticos, sin embargo, a pesar de que el desarrollo de marcadores SSR específicos de la especie implica una tarea laboriosa y costosa, hay también una gran cantidad de información sobre el uso exitoso de marcadores SSR derivados de una especie empleados en otros grupos estrechamente relacionados (Briceño *et al.*, 2010). Es posible utilizar y transferir los SSR diseñados para *P. guajava* L. a otras especies de la familia *Myrtaceae*. Valdés-Infante *et al.* (2010) compararon las características agro-morfológicas y los marcadores moleculares en términos de su nivel de polimorfismo, capacidad de discriminación y su capacidad informativa en 23 genotipos de una colección cubana de germoplasma de guayabo y probaron que los microsatélites fueron altamente polimórficos, mientras que aunque los rasgos agro-morfológicos fueron polimórficos, encontraron un bajo número medio de fases polimórficas por unidad de ensayo. Kanupriya *et al.* (2011) estableció que al utilizar 23 microsatélites se puede establecer el potencia que tienen estos marcadores para discriminar cultivares mediante la generación de un perfil de huella, además que el patrón de agrupamiento que se genera separa claramente los padres de los híbridos.

Los métodos moleculares son útiles para la caracterización de la diversidad genética entre cultivares o especies diferentes, gracias a la identificación de genes de interés y el mejoramiento a través de la transformación genética (Rai *et al.*, 2010).

#### **1.8.5 Reacción en cadena de la polimerasa**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una herramienta que ha aprovechado las bondades de la biología molecular aportando gran valor y versatilidad como técnica de análisis debido en parte a su adaptabilidad y aplicabilidad. La PCR continua siendo un método revolucionario, constituyéndose en una de las técnicas más importantes utilizadas en la biología molecular, cuyo impacto continua haciéndose notar (Méndez-Álvarez y Pérez-Roth, 2004; Das *et al.*, 2012; Bolivar *et al.*, 2014). El hecho de optimizar y estandarizar aplicaciones individuales de la PCR ha permitido el desarrollo de variantes del

método. La denominada PCR múltiple (multiplex-PCR o mPCR), permite realizar reacciones que amplifican simultáneamente en una sola reacción diferentes marcadores (Bolivar *et al.*, 2014).

La mPCR ha sido aplicada en diferentes áreas para el análisis simultáneo de marcadores múltiples incluyendo deleciones, mutaciones, polimorfismos, análisis cuantitativos por transcriptasa reversa, análisis microsatelital (Elnifro *et al.*, 2000; Álvarez *et al.*, 2004). A pesar de este éxito, la inversión de tiempo para la optimización y estandarización puede constituir un factor negativo para la técnica (Bolivar *et al.*, 2014). Las consideraciones que se deben tener en su planificación con el objetivo de obtener una alta especificidad en la amplificación de los productos son la óptima combinación entre temperatura de alineamiento y componentes de la reacción (ADN molde, ADN polimerasa, mezcla de reacción). Estos factores tienen influencia importante en los resultados, ya que previenen la aparición de problemas en la eficiencia del método (Markaulatos *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2012). Debido a esto la optimización de un protocolo de mPCR requiere un delicado balance para la amplificación de productos específicos y la reducción al mínimo de productos inespecíficos, evitando amplificaciones preferenciales (Li *et al.*, 2010; Martínez-Ballesteros *et al.*, 2012). Ha sido demostrado que el aumento del número de iniciadores por reacción incrementa los productos inespecíficos utilizando componentes esenciales, limitando la eficiencia. En los últimos años se han descrito nuevos protocolos de mPCR en los que se mejoran los procesos de extracción de ADN a partir de una gran variedad de material biológico y permite cada vez amplificaciones más sensibles y específicas (Römpler *et al.*, 2006; Yamada *et al.*, 2011). Por lo anterior, la mPCR se proyecta como una herramienta útil que permite el ahorro de tiempo y esfuerzo sin comprometer la efectividad de las pruebas (Stark *et al.*, 2011).

## **1.9 Aplicaciones de los marcadores moleculares**

### **1.9.1 Identificación de genotipos y pureza varietal.**

Esta identificación se basa tradicionalmente en el uso de descriptores morfológicos y fisiológicos, sin embargo varios de los caracteres utilizados como descriptores presentan limitaciones en cuanto al número restringido de variantes, influencia ambiental y dependencia del estadio de desarrollo de la planta. Por lo que las ventajas antes mencionadas hacen a los marcadores moleculares una alternativa para resolver estos problemas y utilizar de manera complementaria de los marcadores morfológicos y fisiológicos para el registro de cultivares. Organismos internacionales como ISTA (International Seed Testing Association) y UPOV (Union Pour La Protection Des Obtenions Vegetales) han desarrollado protocolos para estandarizar los análisis para identificación de cultivares y reglamentar la utilización de diferencias moleculares en el control de la pureza varietal y el otorgamiento de nuevas patentes. (Carrera *et al.*, 2004).

### **1.9.2 Mapeo genético**

Un mapa genético de una especie muestra la distribución linear de un grupo de genes y marcadores en cada uno de los cromosomas que constituyen el genoma de un organismo. Estos mapas están basados en el concepto de ligamiento, es decir, si dos o más genes o marcadores están físicamente cercanos sobre el mismo cromosoma, sus alelos se heredan usualmente juntos. El fundamento del mapeo genético reside en la relación directa entre la frecuencia de recombinación y la distancia física entre los *loci*. Siendo así como determinando la frecuencia de recombinación entre dos genes, se puede estimar la distancia de mapa (Carrera *et al.*, 2004).

### **1.9.3 Selección asistida por marcadores moleculares**

El fundamento de la selección asistida por marcadores moleculares es, que si un marcador resulta estar ligado genéticamente a un gen que controla un carácter de interés agronómico, la selección de este marcador resulta en la selección indirecta del gen de interés. La utilización de marcadores en un programa de mejoramiento aporta una ventaja importante basada en la naturaleza molecular y es que la selección se independiza del fenotipo y del ambiente. Estas características permiten identificar rápidamente genotipos únicos en poblaciones segregantes e incorporar varios genes de interés en un fondo genético, proceso conocido como piramidización de genes (Carrera *et al.*, 2004).

Mediante el uso de selección asistida por marcadores moleculares, el mejorador puede seleccionar marcadores que estén ligados estrechamente a genes de resistencia para la identificación de genotipos. (Chandra and Mishra, 2007).

### **1.9.4 Mapeo comparativo**

El mapeo comparativo se refiere a la comparación de mapas de ligamiento entre diferentes especies. Si un grupo de marcadores moleculares mantienen el orden y sus relaciones de ligamiento entre dos especies se denominan colineares o que muestran sintenia. A partir de marcadores moleculares se pudieron identificar sitios comunes en distintas especies que servían como puntos de referencia para la comparación de sus genomas. Así los mapas comparativos dieron las primeras evidencias de que el ligamiento de grupos de genes podría haberse conservado a través de largos periodos evolutivos (Carrera *et al.*, 2004). La utilidad de los mapas comparativos puede apreciarse desde distintos puntos de vista. Aportan información para conocer los cambios producidos en la estructura cromosómica, permiten evaluar niveles de ploidía (Carrera *et al.*, 2004).

### **1.9.5 Clonado posicional**

El clonado posicional de un gen es un ejemplo de la utilización de la información genética, molecular y del funcionamiento de un genoma para identificar al gen responsable de un carácter particular (Carrera *et al.*, 2004).

### **1.9.6 Estimación del flujo génico**

El flujo génico entre poblaciones vegetales ocurre mediante el movimiento de polen o de semillas. Los marcadores moleculares permiten cuantificar cada uno de estos procesos. Si el flujo génico se produce básicamente a través del polen, los marcadores de ADN de organelos, no serán transmitidos de una población a otra porque este tipo de información es solo heredada por vía materna. En caso contrario, si el flujo génico se realiza principalmente a través de semillas, tanto los marcadores de herencia materna como los de herencia nuclear, serán transmitidos entre poblaciones. La estimación del flujo génico ha cobrado especial relevancia en los estudios tendientes a evaluar el efecto sobre el ambiente de los materiales genéticamente modificados (Carrera *et al.*, 2004).

### **1.9.7 Filogenia**

La filogenia intenta reconstruir las relaciones jerárquicas de descendencia entre especies o grupos de especies y utiliza esta información como criterio de clasificación biológica. El conocimiento de la filogenia y diversidad genética de los recursos silvestres permite optimizar los procesos de hibridación con los materiales cultivados. El procedimiento consiste en calcular un índice de distancia genética sobre la base del número de bandas en común y luego realizar un análisis de agrupamiento (UPGMA) o árbol filogenético, que refleja las relaciones entre los taxa (Carrera *et al.*, 2004).

## 1.10 Variabilidad genética del guayabo

La familia Myrtaceae comprende más de 70 géneros y 2800 especies, que incluye además de la guayaba, algunas otras de importancia agronómica como canela (*Cinnamomum verum* J. Presl), eucalipto (*Eucalyptus*) y feijoa (*Acca sellowiana* Berg). El género *Psidium* tiene cerca de 150 especies, entre las cuales destacan *P. guajava* L ( $2n = 22$ ), *P. cattleianum*, *P. guinnense* Swartz y *P. friedrichsthalianum*. (Pommer y Murakami, 2009).

La disponibilidad de germoplasma de guayabo con una amplia base genética es una parte importante en programas de mejoramiento genético, y permite la generación de genotipos más productivos y resistentes a enfermedades (Sánchez-Teller *et al.*, 2010).

La exploración y colecta de materiales nativos son vías fundamentales para la conservación *ex situ* de la diversidad genética existente en un país o región (Valdés-Infante *et al.*, 2012).

Existe una gran variabilidad de germoplasma en guayabo, el cual se puede encontrar entre o dentro de las parcelas, ya que existen una extensa variedad de características de la fruta (tamaño, forma, color de la piel y pulpa, grosor de la pulpa y número de semillas) (Aranguren *et al.*, 2010). La comparación de ventajas de este germoplasma, puede ayudar a la selección y evaluación de materiales de alta calidad, y permite ofrecer a los consumidores una mayor variación de frutos de guayaba (Padilla-Ramírez y González-Gaona, 2010).

### 1.10.1 Análisis de la diversidad genética en guayabo

La identificación clonal está basada tradicionalmente en diversos caracteres morfológicos, sin embargo, estos caracteres pueden no ser confiables para discriminar entre genotipos de guayaba que estén estrechamente relacionados (Chandra *et al.*, 2007). La detección de variación genética es importante para la micropropagación y la conservación de germoplasma *in vitro* para eliminar variaciones somaclonales indeseables.

Se han realizado diversos trabajos para evaluar la diversidad genética de guayabo utilizando RAPD; Chen *et al.* (2007) determinó la relación filogenética de 18 cultivares de guayaba en Taiwan; por su parte, Feria-Romero *et al.* (2009) utilizó dichos marcadores para identificar marcadores moleculares asociados con la acumulación de quercetina en hojas de árboles de guayabo seleccionados en cuatro diferentes regiones de México. Con el uso de RAPD en colecciones de germoplasma de guayabo, algunos autores han identificado genotipos de diversas regiones (Prakash *et al.*, 2002; Rueda *et al.*, 2006). La interpretación general de relaciones genéticas entre las accesiones de guayabo en Cuba con AFLP (Valdés-Infante *et al.*, 2003) y SSR (Rodríguez *et al.*, 2007) indican la ausencia de grupos separados que representen el germoplasma local y foráneo. Los microsatélites detectaron también un alto número de alelos compartidos por la mayoría de los genotipos de guayabo, lo que sugiere que la mayoría de las accesiones de material vegetal comparten un ancestro común, a partir de que se utilizaron pocas accesiones para los programas de mejoramiento (Pommer y Murakami, 2009).

Hernández-Delgado *et al.* (2007) utilizaron 50 características morfológicas y AFLP para analizar 48 accesiones de guayaba (*Psidium guajava* L.) cultivadas en México, con el fin de dilucidar sus relaciones genéticas. En el estudio se incluyeron dos especies, *P. cattleianum* (Sabine) y *P. friedrichsthalianum* (Berg-Niedenzu) como grupos externos.

El uso de SSR para identificar la variabilidad genética en guayabo es debido a que son extremadamente polimórficos, altamente informativos y codominantes por lo que permiten la distinción entre individuos estrechamente relacionados (Risterucci *et al.*, 2005). Valdés-Infante *et al.* (2007) y Viji *et al.* (2010) utilizaron microsatélites para la identificación de accesiones de guayaba y la caracterización de germoplasma y variación alélica independiente del origen geográfico del cultivar. Coser *et al.* (2012) caracterizó y evaluó la diversidad genética y la divergencia entre 28 genotipos de *P. guajava* cultivados



y plantas de vivero. Nogueira *et al.* (2012) observaron que la diversidad genética existente dentro y entre localidades es independiente del tipo del rasgo estudiado, con lo cual concluyeron que la variabilidad existente puede ser explotada en el mejoramiento genético de guayabo y en programas de conservación. Esta conclusión de utilizar los genotipos silvestres como materiales para el mejoramiento genético de guayabo y aumentar la disponibilidad de materiales con fines comerciales fue propuesta de igual manera por Noia *et al.* (2012).

La construcción de mapas genéticos de ligamiento representa un aspecto muy importante para la caracterización de cultivares, el primer mapa genético para guayaba fue elaborado por Valdés-Infante *et al.* (2007) usando marcadores AFLP, para después ser ampliado por Rodríguez *et al.* (2007) a 220 marcadores AFLP, además de que se localizaron QTLs para varios caracteres vegetativos. El uso eficiente de AFLP y SSR en la construcción de mapas genéticos es posible por el alto polimorfismo que se detecta en el guayabo (Ritter *et al.*, 2010). Debido a la importancia del mapeo genético se elaboró el proyecto GUAVAMAP (Lepitre *et al.*, 2010).

### **1.11 Mejoramiento genético en guayabo**

La mayoría de los programas de mejoramiento del guayabo incluyen los objetivos: coleccionar, introducir, caracterizar y seleccionar genotipos de guayabo con características definidas y apropiadas para la producción. Además, seleccionar genotipos con alto potencial productivo y con mecanismos de resistencia a plagas y enfermedades, así como difundirlos para la formación de huertos comerciales (Pommer, 2012). En países como Israel la producción se basa principalmente en un solo cultivar, se han realizado cruzamientos entre diferentes cultivares provenientes de Brasil, Tailandia y México para la obtención de nuevos cultivares prometedores y aumentar la base genética del cultivo (Zipori *et al.*, 2007). En

Pakistán se han utilizado técnicas no convencionales como la inducción de mutaciones, para tratar de incrementar la variabilidad genética (Zamir *et al.*, 2009). En México se han caracterizado colecciones de germoplasma del cultivo y se ha detectado gran variabilidad genética, principalmente en caracteres de fruto (Martínez –De Lara *et al.*, 2004; Padilla-Ramírez and González-Gaona, 2010). González-Gaona *et al.* (2010) evaluaron 10 selecciones de guayabo y accesiones del país para determinar el grado de tolerancia/susceptibilidad de la raíz a nematodos. El principal programa de mejoramiento se encuentra India, por lo que los productores cuentan con una gran cantidad de cultivares disponibles inclusive se dispone de cultivares específicos para cada estado, sin embargo, el cultivar ‘Allahabad Safeda’ sigue siendo el preferido por los productores (Dinesh y Vasuki, 2010; Pommer, 2012)

## 1.12 Bibliografía

- Acosta M., I. Caballero, Y. Alvarado y M. Leiva (2002)** Microbiota epifítica y contaminantes fungosos del establecimiento *in vitro* de la guayaba (*Psidium guajava* L.). *Biotecnología Vegetal* 2: 67-71.
- Agarwal M., N. Shrivastava and H. Padh (2008)** Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* 27: 617-631.
- Aké A., B. Maust, A. Orozco-Segovia and C. Oropeza (2007)** The effect of gibberellic acid on the *in vitro* germination of coconut zygotic embryos and their conversion into plantlets. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 43: 247 – 253.
- Albany V., N. R., J. A. Vilchez P., Z. J. Viloría, C. Castro y J. Gadea L. (2004)** Propagación asexual del guayabo mediante la técnica de acodo aéreo. *Agronomía Tropical* 54: 63-73.
- Ali N., R. M. S. Mulwa, M. A. Norton and R. M. Skirvin (2003)** Micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 78: 739-741.
- Alvarez J., M. Sota, A. B. Vivanco, I. Perales, R. Cisterna, A. Rementería and J. Garaizar (2004)** Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 1734-1738.
- Andreu P and J. A. Marin (2005)** *In vitro* culture establishment and multiplication of the *Prunus* rootstock ‘Adeseto 101’ (*P. insititia* L.) as affected by the type of propagation of donor plant and by the culture medium composition. *Scientia Horticulturae* 106(2): 258 – 267.
- Aranguren Y., A. Briceño and G. Fermin (2010)** Assessment of the variability of Venezuelan guava landraces by microsatellites. *Acta Horticulturae* 849:147-154.
- Azofeifa-Delgado, A. (2006)** Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17: 221-242.
- Belaj A., Z. Satovis, G. Cipriano, L. Baldono, R. Testolin, L. Rallo and I. Trujillo (2003)** Comparative study of the discriminating capacity of RADP, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in stablishing genetic relationships in olive. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 736 – 744.
- Benson E. E. (2000)** *In vitro* plant recalcitrance: an introduction. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 36: 141–148.
- Beyl C. A. (2010)** PGRs and their use in micropropagation. *In: Plant Tissue Culture, Development and Biotechnology*. Trigiano, R and D, J. Gray (eds). CRC Press. Boca Raton, Florida. pp. 33-56.

- Biswas B. K., N. Joshee, A. Yadav and A. K. Yadav (2007)** Development and application of biotechnology in guava: a nutraceutical fruit. *Acta Horticulturae* 744: 267-276.
- Bolivar A. M., A. Rojas y P. García-Lugo (2014)** PCR y PCR múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina* 3: 25-33.
- Briceño A., Y. Aranguren and G. Fermin (2010)** Assessment of guava-derived SSR markers for the molecular characterization of *Myrtaceae* from different ecosystems in Venezuela. *Acta Horticulturae* 849: 139-146.
- Carrera A., G. Tranquilli, M. Helguera (2004)** Aplicaciones de los marcadores moleculares. *In: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Levitus, G., V. Echenique, C. Rubinstein y L. Mroginski (eds.) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. pp: 26-33.
- Chandra R., A. Bajpai, S. Gupta and R. K. Tiwari (2004)** Embryogenesis and plant regeneration from mecocarp of *Psidium guajava* L. (guava). *Indian Journal Biotechnology* 3: 246 – 248.
- Chandra R. y M. Mishra (2007)** Biotechnological Interventions for Improvement of Guava (*Psidium guajava* L.) *Acta Horticulturae* 735: 117-125.
- Chen T.-W., C.-C. Ng, C.-Y. Wang and Y.-T. Shyu (2007)** Molecular identification and analysis of *Psidium guajava* L. from indigenous tribes of Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis* 15: 82-88.
- Coser M. S., M. P. Fontes M. and F. S. Ferreira (2012)** Pollen viability of guava genotypes from different locations. *Acta Horticulturae* 959: 141-144.
- Das B., S. Swain, A. Patra, M. Das, H. K. Tripathy, N. Mohapatra, S. K. Kar and R. K. Hazra (2012)** Development and evaluation of a single-step multiplex PCR to differentiate the aquatic stages of morphologically similar *Aedes* (subgenus: *Stegomyia*) species. *Tropical Medicine and International Health* 17: 235-243.
- Debnath M., C. P. Malik and P.S. Bisen (2006)** Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 7:33–49.
- Doebley J. F. (1994)** Morphology, molecules and maize. *In: Corn and culture in the prehistoric New World*. S. Johannessen and C. A. Hastorf (eds.) Westview Press. Boulder, Colorado. pp 101 – 112.
- Dinesh M. R. and C. Vasugi (2010)** Guava improvement in India and future needs. *Journal Horticultural Sciences* 5 (2): 94 – 108.
- Elnifro E. M., A. M. Ashshi, R. J. Cooper and P. E. Klapper (2000)** Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiology Reviews* 13: 559-570.

- Excoffier, L (2001)** Analysis of population subdivision. *In: Baldwin, D. J., C. Cannings and M. Bishop (eds.), Handbook of statistical genetics.* John Wiley, Nueva York, pp. 271-308.
- Feria-Romero I. A., H. Astudillo-De la Vega, M. A. Chavez-Soto, E. Rivera-Arce, M. López, H. Serrano and X. Lozoya (2009)** RAPD markers associated with quercetin accumulation in *Psidium guajava*. *Biologia Plantarum* 53:125-128.
- Frankham R., J. D. Ballou and D. A. Briscoe (2003)** Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 617 p.
- Giri C. C., B. Shyamkumar and C. Anjaneyulu (2004)** Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Trees* 18: 115-135.
- González G., E., J. S. Padilla R., L. Reyes M., M. A. Perales de la C. y F. Esquivel V. (2002)** Guayaba: su Cultivo en México. Libro Técnico No. 1. Campo Experimental Pabellón, Centro de Investigación Regional Norte Centro, INIFAP, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural y Alimentación, Aguascalientes, Ags. 182 p.
- González-Gaona E., J. S. Padilla-Ramírez, J. Lozano-Gutiérrez, M. P. España-Luna, R. Velásquez-Valle, G. Gallegos-Morales and M. Cepeda-Siller (2010)** Evaluation of Mexican guava germplasm against root knot nematodes. *Acta Horticulturae*. 849: 363 – 368.
- Grando M. S., D. Bellin, A. Madini, M. Stefanini, C. Pozzi and R. Velasco (2000)** Construction of an AFLP and SSR genetic map of *Vitis* from an interspecific hybrid population. *Proceedings of Plant & Animal Genome Conference VIII*. San Diego USA. p 10.
- Haleem K. A., Naseem and B. Vidya Valdhini (2016)** Evaluation of nutraceuticals in fruit extracts of *Psidium guajava* L. *In: Next Generation DNA Led Technologies.* Avadhanam S., G. Jyothisna, A. Kashyap. (eds). Springer International Publishing. Singapore. pp: 81-99.
- Hernández-Delgado. S., J. Martínez, S. Padilla y N. Mayek (2007)** Diversidad genética de *Psidium* sp. en la región Calvillo-Cañones, México. Primer Simposio Internacional de la Guayaba, pp. 71–83.
- Hussain A., I. Ahmed Q, H. Nazir and I. Ullah (2012)** Plant tissue culture: current status and opportunities. *In: Recent Advances in plant in vitro culture.* Leva A. (ed). InTech, DOI: 10.5772/50568. Available from: <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-plant-in-vitro-culture/plant-tissue-culture-current-status-and-opportunities>.
- IIFT (Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical) (2011)** Instructivo técnico para el cultivo de la guayaba. Asociación Cubana de Técnicos Agrícolas y Forestales. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Ministerio de la Agricultura. La Habana. 38 p.

- Ikeda M., M. Umehara and H. Kamada (2006)** Embryogenesis-related genes; its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology* 23: 153 – 161.
- Jiménez P y C. Collada (2000)** Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en programas de conservación. *Investigación agraria: Sistemas y recursos forestales* 2: 237 – 248.
- Kanupriya, P. M. Latha, C. Aswath, L. Reddy, B. Padmakar, C. Vasugi and M. R. Dinesh (2011)** Cultivar identification and genetic fingerprinting of guava (*Psidium guajava* L.) using microsatellite markers. *International Journal of Fruit Science* 11: 184-196.
- Karp, A., K. Edwards (1997)** DNA markers: a global overview. In: Caetano- Anollés, G. and P. M. Gresshoff (eds.). DNA markers: protocols, aplicaciones and overviews. New York, USA. pp. 1-13.
- Krishna H. and S. K. Singh (2007)** Biotechnological advances in mango (*Mangifera indica* L.) and their future implication in crop improvement—a review. *Biotechnology Advances* 25: 223–243.
- Lepitre V., G. Nansot, R. Grangeon, V. Pomies, R. Rivallan, A. M. Risterucci, J. Valdés-Infante, N. N. Rodríguez-Medina, J. Muth, J. Boike, D. Prüfer, D. Becker, W. Rohde, E. Ritter and N. Billotte (2010)** The microsatellite (SSR)/AFLP reference linkage map of guava. *Acta Horticulturae* 849: 183-192.
- Li W, N. Zhang, P. Gong, L. Cao, J. Li, L. Su, S. Li, Y. Diao, K. Wu, H. Li and X. Zhang (2010)** A novel multiplex PCR coupled with Luminex assay for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* spp., *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis*. *Veterinary Parasitology* 173: 11-18.
- Lim T.K (2012).** Edible medicinal and non medicinal plants Volume 3. Springer. Netherlands. 898 pp.
- Lim T. K. and K Khoo C (1991)** Guava in Malaysia: production, pests and diseases. Ed. Tropical Presss. Kuala Lumpur, Malaysia. 260 p.
- Liu G. and M. Bao (2003)** Adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of London plane tree (*Platanus acerifolia* Willd.). *Plant Cell Reports* 20(7): 640 – 644.
- Malik S. K., R. Chaundhury and R. K. Kalia (2005)** Rapid *in vitro* multiplication and conservation of *Garcinia indica*: a tropical medicinal tree species. *Scientia Horticulturae* 106: 539-553.
- Marcucci P., S., C. Acuña, S. Torales, N. Zelener, L. Harrand, P. Pathaver, G. López y E. Hopp (2005)** Evaluación de la variabilidad genética en huertos semilleros de especies de *Eucalyptus*. IDIA XXI 8: 180-184.

- Markoulatos P., N. Sifakas and M. Moncany (2002)** Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 16: 47-51.
- Martínez-Ballesteros I., B. Paglietti, A. Rementeria, L. Laorden, M. García-Ricobaraza, J. Bikandi, S. Rubino and, J. Garaizar (2012)** Intra- and inter-laboratory evaluation of an improved multiplex-PCR method for detection and typing of *Salmonella*. *Journal of Infection in Developing Countries* 6: 443-451.
- Martínez-De Lara J., J. S. Padilla-Ramírez, S. Hernández-Delado, M. C. Barrientos-Lara, A. C. Reyes-De Anda y N. Mayek-Pérez (2004)** Diversidad fenotípica y genética en huertas del guayabo (*Psidium guajava* L.) de Calvillo, Aguascalientes. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27: 243 – 249.
- Mata B., I. y A. Rodríguez M. (2005)** Cultivo y Producción del Guayabo. Editorial Trillas. México, D.F.160 p.
- Meghwal P. R., S. K. Singh and H. C. Sharma (2003)** Micropropagation of aneuploid guava. *Indian Journal of Horticulture* 60: 29-33.
- Méndez-Álvarez S. y E. Pérez-Roth (2004)** La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 22: 183-192.
- Mishra D. S., J. P. Tiwari and S. H. A. N. T. Lal (2007)** *In vitro* cloning of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Pant Prabhat. *Acta Horticulturae* 735: 127-132.
- Mroginski L., P. Sansberro y E. Flaschland (2004)** Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales,. *In: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Parte I.* Echenique V., C. Rubinstein, L. Mroginski (eds.). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. pp: 35-42.
- Molina D. M., M. E. Aponte, H. Cortina and G. Moreno (2002)** The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 71: 117 – 123.
- Müller M. W. (2003)** Ecofisiología del cultivo del cacao. Seminario Internacional de Agroforestería con Énfasis en Cacao. Bucaramanga. Colombia.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nei, M (1972)** Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106: 283–292.
- Nogueira M. A., H. S. Guilhen J., E. Mangaravite, A. Ferreira and F. S. Ferreira M (2012)** Discriminant analysis of wild guava tree by morphological descriptors and microsatellites. *In: Proceedings of 3rd International Symposium on Guava and Other Myrtaceae*, Petrolina, PE, Brazil. pp: 68.
- Noia L. R., S. M. Coser, J. H. Guilhen S., A. Ferreira and F. S. Ferreira S (2012)** Genetic distance of guava genotypes from different altitudes by microsatellites. *In:*

Proceedings of 3rd International Symposium on Guava and Other Myrtaceae held at Petrolina, PE, Brazil. pp: 67

- Oliveira do N., W. M. e M. S. Padilha de O. (2001)** Caracterização morfológica de frutos em acessos de pupunheira (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes* Khunt). *In: Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe*. Instituto Agronómico do Paraná. Quito, Ecuador. pp: 348-350.
- Padilla-Ramírez J. S. and E. González-Gaona (2010)** Collection and characterization of Mexican guava (*Psidium guajava* L.) germplasm. *Acta Horticulturae* 849: 49-54.
- Padilla-Ramírez J. S., E. González-Gaona, F. Esquivel-Villagrana, E. Mercado-Silva, S. Hernández-Delgado y N. Mayek-Pérez (2002)** Caracterización del germoplasma sobresaliente de guayabo en la región Calvillo-Cañones, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25(4): 393 – 399.
- PEGUAM (Productores y Empacadores Exportadores de Guayaba en México) (2013)** Diagnostico de las necesidades de infraestructura estratégica para impulsar el mercado de exportación de guayaba. [http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios\\_promercado/Diagn%C3%B3stico%20de%20necesidades%20de%20infraestructura%20para%20impulsar%20la%20export.%20de%20guayaba.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/Diagn%C3%B3stico%20de%20necesidades%20de%20infraestructura%20para%20impulsar%20la%20export.%20de%20guayaba.pdf). (Consultado 22 de febrero de 2016).
- Picca A., M. Helguera, N. Salomón y A. Carrera (2004)** Marcadores moleculares. *In: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Parte I. Echenique V., C. Rubinstein y L. Mroginski (eds.). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. pp: 61-68.
- Piñero D., A. Barahona, L. Eguiarte, A. Rocha y R. Salas (2008)** La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. *En: Capital natural de México Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. CONABIO, México. pp 415 – 435.
- Pommer C .V (2012)** Guava world-wide breeding: major techniques and cultivars and future challenges. *Acta Horticulturae* 959: 81 – 88.
- Pommer C. V. and K. R. N. Murakami (2009)** Breeding guava (*Psidium guajava* L.). *Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species*. *In: Jain, S. M. and P. M. Priyadarshan* (eds.). Springer. New York. pp: 83-120.
- Pontikis C. A. (1996)** *Psidium guajava* L. (Guava). *In: Biotechnology in Agriculture and Forestry 35. Trees IV*. Bajaj, Y. P. S. (ed). Springer-Verlag, New York. pp: 308-320.
- Prakash D. P., P. Narayanaswamy and S. N. Sondur (2002)** Analysis of molecular diversity in guava using RAPD markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77: 287–293
- Radice S (2004)** Morfogénesis. *In: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Levitus, G., V. Echenique., C. Rubinstein y L. Mroginski (eds.) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. pp: 26-33.



- Rai M. K., P. Asthana, V. S. Jaiswal and U. Jaiswal (2010)** Biotechnological advances in guava (*Psidium guajava* L.): recent developments and prospects for further research. *Trees* 24: 1-12.
- Rai R (2007)** Introduction to plant biotechnology. <http://nsdl.niscair.res.in/bitstream/123456789/668/1/revised+introduction+to+plant+biotechnology.pdf> (Consultado 2 de abril de 2016).
- Ramage C. M. and R. R. Williams (2002)** Inorganic nitrogen requirements during shoot organogenesis in tobacco leaf discs. *Journal of Experimental Botany* 53(373): 1437 – 1443.
- Rao V. R. and T. Hodgkin (2002)** Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plan Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 1-19.
- Razdan M. K (2003)** Introduction to plant tissue culture. 2nd ed. Science Publishers. Inc. Enfield, NH, USA. 388 p.
- Reuvenil M., D. Evenor (2007)** On the effect of light on shoot regeneration in petunia. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 89: 49 – 54.
- Reynolds M. P., R. Threthowan, J. Crossa, M. Vargas and K. D. Sayre (2002)** Physiological factors associated with genotype by environment interaction in wheat. *Field Crops Reserch* 75: 139-160.
- Risterucci A. M., M. F. Duval, W. Rohde and N. Billotte (2005)** Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. *Molecula Ecology Notes* 5: 745–748.
- Ritter E., A. Herran, J. Valdés-Infante, N. N. Rodríguez-Medina, A. Briceño, G. Fermin, F. Sanchez-Teyer, A. O'Connor-Sanchez, J. Muth, J. Boike, D. Prüfer, C. A. Santos, I. C. Nunes dos Santons, M. A. Rodrigues, A. M. Risterucci, N. Billotte, D. Becker and W. Rohde (2010)** Comparative linkage mapping in three guava mapping populations and construction of an integrated reference map in guava. *Acta Horticulturae* 849: 175-182.
- Rodríguez N., J. Valdés-Infante, D. Becker, B. Velázquez, G. González, D. Sourd, J. Rodríguez, N. Billotte, A. M. Risterucci, E. Ritter and W. Rohde (2007)** Characterization of guava accessions by SSR markers, extension of the molecular linkage map, and mapping of QTLs for vegetative and reproductive characters. *Acta Horticulturae* 735: 201–216.
- Römpler H., P. H. Dear, J. Krause, M. Meyer, N. Rohland, T. Schöneberg, H. Spriggs, M. Stiller and M. Hofreiter (2006)** Multiplex amplification of ancient DNA. *Nature Protocols* 1: 720-728.
- Rout G. R., S. Samantaray and P. Das (2000)** *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances* 18: 91-120.

- Rueda A., J. D. Palacio, J. E. Muñoz, R. Saavedra y E. Bravo (2006)** Caracterización molecular del banco de germoplasma de guayaba *Psidium* spp. del Centro de Investigación Corpoica-Palmira. *Fitotecnia Colombiana* 6: 26-32.
- Saad, A. I. M. and A. M. Elshahed (2012)** Plant tissue culture media. In: Recent Advances in Plant *in vitro* Culture. Leva, A. and L. M. R. Rinaldi (eds.), InTech, pp: 29-40. <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-plant-in-vitro-culture/plant-tissue-culture-media> (Consultado 11 de febrero de 2016). Sánchez V. P (1990) Myrtaceae. Flora de Veracruz, México 62: 1 – 46.
- Sánchez-Teyer L. F., A. Barraza-Morales, L. Keb, F. Barredo, A. Quiroz-Moreno, A. O'Connor-Sánchez and J. S. Padilla-Ramírez (2010)** Assessment of genetic diversity of Mexican guava germplasm using DNA molecular markers. *Acta Horticulturae* 849:133-138.
- Santana N., M. E. González, M. Valcárcel, A. Canto-Flick, M. Hernández, F. J. Fuentes-Cerda, F. Barahona, J. Mijangos-Cortés and V. M. Lozoya-Vargas (2004)** Somatic embryogenesis : a valuable alternative for propagation selected robusta coffee (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 40 (1): 95 – 101.
- Segura J. (2008)** Citoquininas. In: Fundamentos de Fisiología vegetal. Azcón-Bieto, J. y M. Talón (eds.). McGraw-Hill. Barcelona, España. pp: 421-444.
- Shah S. T., R. Zamir, J. Ahmad, H. Ali and G. Lutfullah (2008)** *In vitro* regeneration of plantlets from seedling explants of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Safeda. *Pakistan Journal of Botany* 40: 1195-1200.
- Sharma A. S., S. K. Sehrawat, R. S. Singhrot and K. S. Boora (2007)** Assessment of genetic diversity and relationship among *Psidium* spp. through RAPD analysis. *Acta Horticulturae* 735: 71-78.
- Shen S.-C., F.-C. Chen and N. J. Wu (2008)** Effect of guava (*Psidium guajava* Linn.) leaf soluble solids on glucose metabolism in type 2 diabetic rats. *Phytotherapy Research* 22: 1458–1464.
- SIAP (Servicio de Información Agrolimentaria y Pesquera) (2015)** Cierre de la producción agrícola por cultivo. Servicio de Información Agrolimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México, D.F. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>. (Consultado 2 de octubre de 2015).
- Singh G (2005)** High density planting in guava-application of canopy architecture. *ICAR News* 11: 9–10.
- Singh M., U. Jaiswal and V. S. Jaiswal (2004)** *In vitro* regeneration and improvement in tropical fruit trees: an assessment. In: Srivastava P. S., A. Narula and S. Srivastava (eds.). Plant Biotechnology and Molecular Markers. Anamaya Publishers. New Delhi. pp: 228-243.

- Singh S. K., P. R. Meghwal, H. C. Sharma and S. P. Singh (2002)** Direct shoot organogenesis on hypocotyl explants from *in vitro* germinated seedlings of *Psidium guajava* L. cv. Allahabad Safeda. *Scientia Horticulturae* 95: 213-221.
- Stark D., S. E. Al-Qassab, J. L. N. Barratt, K. Stanley, T. Roberts, D. Marriott, J. Harkness and J. T. Ellis (2011)** Evaluation of multiplex tandem real-time PCR for detection of *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, and *Giardia intestinalis* in clinical stool samples. *Journal of Clinical Microbiology* 49: 257- 262.
- Tapia C., E., M. A. Gutiérrez E., M. L. Warburton, A. Santacruz V. y A. Villegas M. (2005)** Characterization of mandarin (*Citrus* spp.) using morphological and AFLP markers. *Interciencia* 30: 687-693.
- Thomas P. and J. W. Schiefelbein (2001)** Combined *in vitro* and *in vivo* propagation for rapid multiplication of grapevine cv. Arka Neelamani. *HortScience* 36: 1107-1110.
- Thorpe T (2007)** History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*. 37: 169-180.
- Thorpe T (2012)** History of plant tissue culture. *In: Plant cell culture protocols*. Loyola-Vargas, V. M. and N. Ochoa-Alejo (eds). Humana press. Hertfordshire, UK. pp: 9 - 28.
- Valdés-Infante J., D. Becker, N. N. Rodríguez, B. Velásquez, G. González, D. Sourd, L. Rodríguez, E. Ritter and W. Rohde (2003)** Molecular characterization of Cuban accessions of guava (*Psidium guajava* L.), establishment of a first molecular linkage map and mapping of QTLs for vegetative characters. *Journal of Genetics and Breeding* 57: 349–357.
- Valdés-Infante J., N. Nerdo R., J. B. Velásquez, D. G. Sourd, G. Gonzalez, J. A. Rodríguez y W. Rohde (2012)** Herramientas para un programa de mejoramiento genético del guayabo (*Psidium guajava* L.) en Cuba. *Agronomía Costarricense* 36: 111–129.
- Valdés-Infante J., N. N. Rodríguez, D. Becker, B. Velásquez, D. Sourd, G. Espinosa and W. Rohde (2007)** Microsatellite characterization of guava (*Psidium guajava* L.) germplasm collection in Cuba. *Cultivos Tropicales* 28: 61-67.
- Valdés-Infante J., N. N. Rodríguez-Medina, B. Velásquez, D. Rivero, F. Martínez, A.-M. Risterucci, N. Billotte, D. Becker, E. Ritter and W. Rohde (2010)** Comparison of the polymorphism level, discriminating capacity and informativeness of morph-agronomic traits and molecular markers in guava (*Psidium guajava* L.). *Acta Horticulturae* 849: 121-132.
- Viji G., D. L. Harris, A. K. Yadav and F. T. Zee (2010)** Use of microsatellite markers to characterize genetic diversity of selected accessions of guava (*Psidium guajava*L.) in the United States. *Acta Horticulturae* 859: 169–176.

- Yamada H., A. Nishikawa, T. Yamamoto, Y. Mizue, T. Yamada, M. Morizane, S. Tairaku and J. Nishihira (2011)** Prospective study of congenital toxoplasmosis screening with use of IgG avidity and multiplex nested PCR methods. *Journal of Clinical Microbiology* 49: 2552-2556.
- Yin S, S. Yang, Y. Shang, X. Cai and X. Liu (2012)** Development and optimization of multiplex-PCR for simultaneous detection of Porcine Pseudorabies Virus, Porcine Parvovirus and Porcine Circovirus Type 2. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* 10: 169-175.
- Zamir R., N. Ali, S. T. Shah, T. Mohammad and J. Ahmad (2009)** Guava (*Psidium guajava* L.) improvement using in vivo and in vitro induced mutagenesis. *In: Induced Mutation in Tropical Fruit Trees*. IAEA-TECDOC 1615. pp: 100 – 112.
- Zamir R., N. Ali, S. T. Shah, T. Muhammad and S. A. Shah (2007)** *In vitro* re-generation of guava (*Psidium guajava* L.) from shoot tips of mature trees. *Pakistan Journal of Botany* 39: 2395-2398.
- Zipori I., S. Shuker, A. Dag and E. Tomer (2007)** Guava breeding in Israel. *Acta Horticulturae* 735: 39 – 47.

## CAPITULO I

### PROPAGACIÓN *in vitro* DE SELECCIONES DE GUAYABO (*Psidium guajava* L.)<sup>1</sup>

#### 2.1 Resumen

La propagación *in vitro* mediante organogénesis directa de brotes de guayabo (*Psidium guajava* L.) constituye una alternativa para la rápida obtención de plantas productivas. El presente trabajo tuvo como objetivo el optimizar un protocolo de regeneración *in vitro* a partir de ápices y segmentos nodales para cinco diferentes genotipos de guayabo con alto potencial comercial [Paluma 12 (Pm 12), Paluma 6 (Pm6), 17-06, Roja Exterior Redonda (RER) y Roja Chapeada Grande (CH.R.G)]. Varios genotipos presentaron problemas de fenolización, por lo que se evaluó la adición de polivinilpirrolidona (PVPP) en el medio de cultivo como agente antioxidante del material vegetal. Los genotipos RER y CH.R.G. presentaron menor número de brotes, con 10 y 0 % de fenolización. En la fase de multiplicación de propágulos los mejores resultados fueron obtenidos cuando los brotes se desarrollaron en el medio Murashige y Skoog (MS) con el suplemento de 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 30 mg L<sup>-1</sup> de adenina para los genotipos PM 6 y PM 12, mientras que para el genotipo 17 – 06 tuvo mejor desarrollo con la adición de 15 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina. La adición de 40 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina representó el mejor tratamiento para los genotipos RER y CH.R.G. El enraizamiento se indujo satisfactoriamente mediante la incubación de los brotes durante 24 horas en medio MS suplementado con 2.54 mg L<sup>-1</sup> de AIA para el genotipo 17-06, 1.34 mg L<sup>-1</sup> de AIB para los genotipos PM6 y RER y de 2.94 de AIB para los genotipos CH.R.G. y PM12.

**Palabras clave:** Organogénesis directa, cultivo de tejidos vegetales, optimización de protocolo, genotipos.

<sup>1</sup>Enviado para su publicación como artículo científico en la Revista Fitotecnia Mexicana

## 2.2 Summary

*In vitro* propagation of guava shoots by direct organogenesis is an alternative for quickly obtaining productive plants. The objective of this work was to optimize a protocol for *in vitro* regeneration from apexes and nodal segments of five different genotypes of guava with high commercial potential [Paluma 12 (Pm 12), Paluma 6 (Pm 6), 17-06, Roja Exterior Redonda (RER) and Roja Chapeada Grande (CH. R.G.)]. Several genotypes presented problems with phenolization, so that the addition of polyvinylpyrrolidone (PPVP) was evaluated in the culture medium as an antioxidant from plant material. The genotypes RER and CH.R.G had fewer problems of phenolization 10 y 0 %, respectively. In the multiplication phase, the best results with genotypes PM 6 and PM 12 were obtained when their shoots were grown on Murashige y Skoog medium (MS) supplemented with BAP 0.5 mg L<sup>-1</sup> and adenine 30 mg L<sup>-1</sup>, while for 17-06 the addition of adenine sulfate 15 mg L<sup>-1</sup> induced better development. Addition of adenine sulfate 40 mg L<sup>-1</sup> represented the best treatment for RER and CH.R.G. Rooting was induced by incubation of shoots for 24 hours on MS medium supplemented with IAA 2.54 mg L<sup>-1</sup> for 17-06 genotype, while IBA 1.34 mg L<sup>-1</sup> induced rooting of PM 6 and RER genotypes, and 2.94 mg L<sup>-1</sup> IBA promoted rooting of CH.R.G. and PM 12.

**Key words:** Direct organogenesis, plant tissue culture, protocol optimization, genotypes.

### 2.3 Introducción

México es uno de los principales productores y exportadores de guayaba y sus derivados en el mundo. A pesar de esto, en los últimos años la superficie plantada y su producción han venido en decremento, ya que para 2013 la superficie plantada fue de 21,000 Ha., mientras que para 2007 se reportaron 23,621 Ha. (SAGARPA, 2014). Esta situación se debe tanto a la alta heterogeneidad de las huertas como a la producción; además de que la producción de guayaba está basada casi exclusivamente en el cultivar 'Media China' (Padilla *et al.*, 2002).

La generación y distribución de nuevos cultivares, en especial aquellos que presenten pigmentación en sus frutos o sean de pulpa roja o rosada es una de las alternativas para cubrir las nuevas perspectivas en los mercados nacionales e internacionales, pues en los últimos años se ha incrementado la exigencia para la obtención de cultivares con altos contenidos de compuestos antioxidantes, como la vitamina C, carotenoides y compuestos fenólicos (Carvalho *et al.*, 2006; Chorilli *et al.*, 2007).

La complementación de los métodos convencionales de propagación con herramientas biotecnológicas como el cultivo de tejidos constituyen una alternativa para la reproducción. En el guayabo se han abordado diferentes métodos de propagación *in vitro* a través de la organogénesis, la embriogénesis somática y semilla sintética, desarrollados a partir de explantes de ápices, segmentos nodales y embriones zigóticos (Chandra *et al.*, 2004; Biswas *et al.*, 2007; Rai *et al.*, 2007; Rai *et al.*, 2010). No obstante, la propagación se ha caracterizado por una baja eficiencia en la obtención de plantas, debido a la pérdida de explantes en la etapa inicial del establecimiento provocada principalmente por una alta oxidación fenólica y persistencia de contaminaciones bacterianas, así como un bajo coeficiente de multiplicación en etapas subsecuentes. Lo anterior ha conducido al desarrollo de protocolos para superar

estas barreras biológicas (Pérez *et al.*, 2002; Concepción *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2007a); sin embargo, no todos los genotipos de guayaba responden de la misma forma a los diferentes protocolos de micropropagación, por lo que se hace indispensable la generación de protocolos específicos para cada cultivar o genotipo de la especie. A pesar que México es considerado centro de origen, son pocos los trabajos de investigación publicados con relación al uso de la micropropagación del guayabo, por lo que debido a la amplia variabilidad genética existente en nuestro país, los protocolos de propagación *in vitro* deben ajustarse a los tipos de guayabo y a las condiciones ambientales, de ahí la importancia que adquiere la presente investigación.

Con base en lo anterior, considerando la falta de nuevas variedades y su propagación a gran escala, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de PVPP como antioxidante y el tipo de explante en la fase de establecimiento *in vitro*, así como el efecto del uso de la adenina y sulfato de adenina en la proliferación de brotes; además con el fin de promover la rizogénesis por medio de la adición de auxinas en el medio de cultivo, en cinco diferentes genotipos de guayabo evaluados en Tabasco, Zacatecas y con alto potencial comercial para la región de los Cañones del estado.

## **2. 4 Materiales y Métodos**

La fase experimental del presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de Centros Regionales en la Universidad Autónoma Chapingo, UACH, ubicado en el km. 38.5 de la Carretera México-Texcoco, Edo. De México.

### **Material Vegetal**

Se consideraron cinco genotipos de guayabo: ‘Paluma 12’ (Pm 12), ‘Paluma 6’ (Pm 6), ‘17-06’, ‘Roja Exterior Redonda’ (RER) y ‘Roja Chapeada Grande’ (CH.R.G). Estos genotipos fueron seleccionados de parcelas demostrativas en el municipio de Tabasco,



Zacatecas; los parámetros que se utilizaron para su selección fueron tamaño y forma de fruto, color y grosor de pulpa, así como su rendimiento en campo.

### **Propagación *in vitro* de materiales de guayabo**

#### **Experimento 1. Establecimiento**

Se colectaron dos tipos de explantes de árboles de 2 – 3 años de edad en condiciones de invernadero, donde se mantuvieron las plantas en condiciones óptimas de fertilidad, humedad y sanidad mediante la aplicación constante de Curamicin® y Bactrimicin©, la colecta se realizó durante los meses de septiembre – diciembre de 2012: ápices de aproximadamente 2 cm de longitud, y el primer nudo, los cuales se lavaron con detergente comercial durante 10 minutos y se enjuagaron en agua corriente. Después del lavado se realizó una desinfección superficial con hipoclorito de calcio ( $\text{CaCl}_2\text{O}_2$ ) al 3 % conteniendo 3 gotas de Tween® 80 durante 10 minutos, con agitación constante. Los explantes ya desinfectados se colocaron individualmente en tubos de ensayo que contenían medio sólido de establecimiento, constituido por medio basal MS (Murashige y Skog, 1962) suplementado con sacarosa 30 g  $\text{L}^{-1}$ , myo-inositol 100 mg  $\text{L}^{-1}$ , tiamina 0.1 mg  $\text{L}^{-1}$ , polivinilpirrolidona (PVPP) 0.5 g  $\text{L}^{-1}$  y como agente solidificante se utilizó 6 g  $\text{L}^{-1}$  de agar (Merck®). Después de establecer los explantes en el medio, se colocó la tapa de polipropileno y se sellaron los tubos, e incubaron durante 10 días en condiciones de luz artificial indirecta (evitando el contacto directo con las lámparas), un fotoperiodo de 16 horas luz y una temperatura de  $25 \pm 2$  °C. La unidad experimental constó de 10 explantes, el diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones, siendo el factor a evaluar el genotipo y el tipo de explanto. La evaluación se hizo de manera visual a los 10 días después de la siembra de los explantes. Se evaluó el porcentaje de supervivencia, el porcentaje de pérdida por oxidación fenólica, y contaminación por hongos y bacterias. La oxidación fenólica se evaluó aplicando un valor

cualitativo, tomando en cuenta dos aspectos, primero la oxidación o necrosamiento en el explante, y segundo, la liberación de los fenoles del explante al medio de cultivo. Se usó una calificación de 1 a 3 [1= baja, 2= media (50 % del explante necrosado) y 3= alta (explante totalmente necrosado)] dependiendo de la cantidad de fenoles. Considerando el nivel tres como pérdida del explante.

## **Experimento 2. Multiplicación de propágulos**

Esta etapa de la propagación constó de dos fases:

### **Fase 1. Efecto de la bencilaminopurina**

Se evaluó la incorporación de bencilaminopurina (BAP) al medio de cultivo, en su efecto en el desarrollo de nuevos brotes para los genotipos 'PM12', 'PM6' y 'CH.R.G.' (los genotipos 'RER' y '17-06' se evaluaron en una investigación anterior). Se utilizaron brotes de tres nudos ya establecidos *in vitro*, los cuales fueron transferidos a frascos de cultivo que contenían 25 mL de medio semisólido de multiplicación, constituido por el medio basal MS suplementado con sacarosa 30 g L<sup>-1</sup>, myo-inositol 100 mg L<sup>-1</sup> y tiamina 0.1 mg L<sup>-1</sup> al que se incorporó BAP en concentraciones diferentes (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg L<sup>-1</sup>). Los cultivos se incubaron durante 30 días en condiciones de luz artificial por lámparas fluorescentes, un fotoperiodo de 16 horas luz, una intensidad de 2000 luz y una temperatura de 25 ± 2 °C. La unidad experimental consistió en un frasco con seis brotes, el diseño experimental fue completamente al azar con cuatro repeticiones, y los factores fueron el genotipo y la concentración de BAP. A los 30 días de iniciados los tratamientos, se evaluó la longitud del brote inicial (LBI), el número de brotes por explante (NB), longitud de brotes (LB), el número de nudos del brote (NN), y el coeficiente de multiplicación (CM). El CM se calculó mediante la siguiente formula:

$$CM = \frac{\text{cantidad de segmentos y brotes de tallo final}}{\text{cantidad de segmentos y brotes del tallo oficial}}$$

## **Fase 2. Efecto de adenina y sulfato de adenina**

Debido a los bajos CM obtenidos en el experimento anterior y con base en información encontrada para otras especies (Bantawa *et al.*, 2009; Nadagopal y Kumari, 2006), se optó por utilizar dos precursores de citocininas (adenina y el sulfato de adenina) para complementar el medio de cultivo. El medio de cultivo utilizado fue igual al del experimento anterior, adicionado con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (testigo).

El diseño fue completamente al azar, con arreglo de tratamiento factorial, con los factores: genotipo, en cinco niveles, tipo de precursor en dos niveles, adenina y sulfato de adenina; y el factor concentración de precursor, en cinco niveles (: 0, 15, 20, 30 y 40 mg L<sup>-1</sup>). Los cultivos se incubaron durante 30 días en condiciones similares al experimento anterior. La unidad experimental consistió de un frasco con seis brotes, con cuatro repeticiones. La evaluación de las variables se realizó a los 30 días del inicio de los tratamientos y se consideraron las mismas variables que en el experimento anterior.

## **Experimento 3. Enraizamiento**

Se evaluó la respuesta del enraizamiento de brotes de los cinco genotipos de guayabo con diferentes reguladores de crecimiento de carácter auxínico. Se utilizaron brotes provenientes de la fase de multiplicación, los cuales fueron previamente homogeneizados en longitud (1.5 cm). Para inducir que los brotes formasen raíces adventicias, éstos se colocaron en frascos con 25 mL de medio semisólido de enraizamiento durante 24 horas, el cual estaba constituido por el medio basal MS complementado con sacarosa 30 g L<sup>-1</sup>, myo-inositol 100 mg L<sup>-1</sup> y tiamina 0.1 mg L<sup>-1</sup> al que se agregaron diferentes tipos y concentraciones de auxinas. Transcurrido el tiempo de inducción los brotes se transfirieron a frascos con medio basal MS.

El diseño experimental es completamente al azar, con arreglo de tratamientos factorial, en donde los factores fueron: genotipo, en cinco niveles; factor tipo de auxina, en dos niveles (ácido 3-indolacético, AIA y ácido 3-indolbutírico, AIB); y factor de concentración de auxina, en cuatro niveles (0, 6.6, 14.5 y 29  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Los cultivos se incubaron durante 25 días en condiciones de luz artificial por lámparas fluorescentes, un fotoperiodo de 16 horas luz, una intensidad de 2000 lux y una temperatura de  $25 \pm 2$  °C. La unidad experimental consistió en un frasco con seis brotes, con tres repeticiones por tratamiento. Se evaluó la cinética de enraizamiento de los genotipos, con conteos diarios de la aparición de las raíces así como el conteo final del número y longitud de las raíces, hasta los 25 días después de la inducción.

### **Análisis estadístico**

Para el procesamiento de los datos de los diferentes experimentos, se aplicaron las pruebas de estadísticas para comprobar los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas. Al no cumplirse los supuestos, se aplicó la transformación de datos por medio de la fórmula  $X' = \sqrt{x + 1}$  (donde  $X'$  = valor transformado;  $x$  = valor original). Mientras que para las variables presentadas en porcentajes se hizo la transformación de datos por medio de la fórmula  $X' = \text{ARCSEN}\sqrt{x}$ . Para desarrollar estos procedimientos se utilizó el paquete estadístico SAS versión 9.0. A los datos transformados y no transformados se les aplicó análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba de comparación DHS de Tukey, con el paquete estadístico SAS versión 9.0.

## **2.5 Resultados y Discusión**

### **Experimento 1. Establecimiento**

La fenolización se caracteriza por un necrosamiento del tejido vegetal, y la emisión de coloraciones al medio de cultivo (Abdelwahd *et al.*, 2008), en todos explantos ápices y nudos

sometidos a todos los tratamientos se mostraron estos síntomas, pero en diferentes intensidades. En la Figura 2.1 se muestran los niveles de fenolización de ápices y nudos de los diferentes genotipos de guayabo, expresados en porcentaje (%) para cada tratamiento. De acuerdo al ANDEVA se encontraron diferencias significativas entre los genotipos, para las variables evaluadas, mientras que el tipo de explante sólo influyó significativamente en la contaminación por hongos. Se observó que las yemas (ápice y 1er nudo) de los cinco genotipos en presencia de 0.5 g L<sup>-1</sup> de PVPP, no fueron afectadas significativamente por la presencia de fenoles en el cultivo *in vitro* siendo el genotipo ‘PM6’ el que mostró mayor pérdida de explantes (34%), el cual difirió significativamente de los otros genotipos. El genotipo ‘CH.R.G’ fue el que presentó menor oscurecimiento (93 %) con baja presencia de fenoles tanto en el tejido como en el medio de cultivo y fue significativamente diferente del resto de genotipos. En general, todos los genotipos presentaron un porcentaje bajo de oxidación por fenoles, siendo los valores más altos alcanzados de un 34 % de explantes con alto nivel de fenolización y 37 % con un nivel medio para los genotipos ‘PM6’ y ‘17-06’, respectivamente. Estos resultados concuerdan parcialmente con los obtenidos por Concepción *et al.*, (2005) quienes reportaron que la adición de 0.5 % de PVPP como antioxidante en el medio de cultivo fue efectivo para establecer explantes que mostraron niveles más bajos de fenolización, en el establecimiento de yemas de guayabo ‘Enana Roja Cubana’; sin embargo, este genotipo cubano solo alcanzó el 24 % de explantes con leve fenolización. Estos resultados ratifican el uso de PVPP como antioxidante ya que ha sido utilizado en guayaba (Pérez *et al.*, 2002; Ali *et al.*, 2003; Concepción *et al.*, 2005), adicionalmente Concepción *et al.*, (2005) mencionó que el necrosamiento varió de acuerdo con el genotipo y que se pudo revertir con el uso de PVPP.

La contaminación microbiana es uno de los factores limitantes más importantes para el inicio del cultivo *in vitro* vegetal (Krishna y Singh, 2007), que resulta en la muerte de los explantes o puede retrasar su desarrollo. En la Figura 2.2 se observan algunas diferencias en las pérdidas de explantes por contaminación bacteriana y fúngica, siendo los genotipos más afectados el '17-06', con una supervivencia de 74 % para los ápices y de 68 % para los nudos, y 'PM6' con una supervivencia de 57% para los nudos. El genotipo 'RER' no mostró pérdidas de explantes por contaminación, además de ser uno de los que menos fenolización presentó, lo que lo hace un genotipo potencial para su manejo *in vitro*. Al igual que para el caso de la oxidación, los explantes tuvieron un comportamiento uniforme, las diferencias mostradas fueron atribuidas al genotipo y no al tipo de explante, por lo que se pueden utilizar tanto ápices y nudos para el establecimiento de los cultivos *in vitro*. El uso del hipoclorito de calcio como desinfectante para estos genotipos sustituye al bicloruro de mercurio que es el desinfectante mayormente utilizado para guayabo (Concepción *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2007a; Ocampo y Núñez, 2007), los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante (Van Staden *et al.*, 2006; Abdelward *et al.*, 2008).

## **Experimento 2. Multiplicación**

### **Fase 1. Efecto de bencialaminopurina**

En el Cuadro 1.1 se presentan los valores promedio de las variables en estudio, para tres genotipos de guayabo. La longitud inicial del brote y número de nudos fueron estadísticamente igual para todos los tratamientos. Transcurrido 30 días de incubación la respuesta de los tres genotipos fue diferente para las concentraciones de BAP, el genotipo 'CH.R.G.' respondió favorablemente a la concentración de 1.0 mg L<sup>-1</sup>, tratamiento en donde se observó la mayor longitud de brotes (de 1.04 – 1.37 mm) con respecto al testigo. El genotipo 'PM12' presentó una mejor respuesta a la concentración de 0.5 mg L<sup>-1</sup> donde las

variables número de brotes y coeficiente de multiplicación tuvieron los mayores valores (2.41 y 2.83, respectivamente). El genotipo 'PM6' mostró una mayor respuesta a una concentración de 2.0 mg L<sup>-1</sup> para la variable número de brotes (2.17); sin embargo, el coeficiente de multiplicación tuvo un mejor comportamiento con una concentración de 0.5 mg L<sup>-1</sup> (2.05), lo que se debió a que los brotes tuvieron un mayor tamaño a una concentración de 0.5 mg L<sup>-1</sup> y pudieron ser separados del brote inicial.

Los resultados indican que cada genotipo respondió de diferente manera a los reguladores de crecimiento, por lo cual es importante el establecimiento de protocolos específicos para cada genotipo, lo que confirma lo reportado por Papadatou *et al.*, (1990) y Ali *et al.*, (2003) en el sentido; que los niveles de citocininas son los más críticos para la multiplicación de muchos de los árboles tropicales, siendo la BAP la citocinina más comúnmente usada en la propagación de guayabo.

Una exitosa regeneración *in vitro* depende del control de la morfogénesis, la cual se influye por diversos factores como el tipo de explante, la composición del medio de cultivo, los reguladores de crecimiento y el ambiente durante la incubación (Rai *et al.*, 2010). El éxito de la micropropagación en especies arbóreas difíciles y recalcitrantes, depende principalmente de la calidad de los explantes, esta calidad está determinada en gran medida por el genotipo, el estado fisiológico del tejido, y la época del año en que se colectaron (Giri *et al.*, 2004).

## **Fase 2. Efecto de la adenina y el sulfato de adenina**

En el Cuadro 2.2 se observan los valores promedio de las variables evaluadas, para cinco genotipos de guayabo. Las diferencias estadísticas encontradas dependen en gran medida de la respuesta de los genotipos a los diferentes tratamientos. Para el genotipo 'PM6' se observó que su comportamiento promedio fue mejor cuando se desarrolló en medio de cultivo enriquecido con 30 mg L<sup>-1</sup> de adenina, la variable número de brotes aumentó de 1.61 a 3.54

con respecto al testigo, igualmente el coeficiente de multiplicación aumentó de 2.02 a 3.5. El genotipo 'PM12' también se comportó mejor en presencia de la misma concentración de adenina, pues la longitud de los brotes aumentó de 97 a 180 mm con respecto al testigo, así como el coeficiente de multiplicación aumentó de 2.83 a 4.31. El genotipo '17-06' presentó una mayor respuesta al sulfato de adenina como precursor de citocininas. La variable número de brotes aumentó de 1.83 a 2.54, con una concentración de 20 mg L<sup>-1</sup> con respecto al testigo, mientras que la mayor longitud de brotes se obtuvo con una concentración de 15 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina, el coeficiente de multiplicación está altamente influenciada por las otras variables. El genotipo 'CH.R.G.' se vio afectado en el número de brotes cuando se añadió una concentración de 40 mg L<sup>-1</sup> adenina con valores por debajo del testigo, mientras que con una concentración de 15 mg L<sup>-1</sup> de adenina se aumentó la longitud de los brotes de 44 a 92 mm y el coeficiente de multiplicación de 2.71. Por otro lado, el genotipo 'RER' mostró un mejor comportamiento promedio al desarrollarse en medio adicionado con sulfato de adenina 40 mg L<sup>-1</sup>, donde las variables NB, LB y el CM tuvieron los valores más altos (2.15, 105 mm y 3.40, respectivamente).

La adenina exhibe actividad similar a las citocininas sobre el desarrollo de brotes axilares, como lo describe Wróblewska (2012) en esquejes de *Fuchsia hybrida*; sin embargo, no muestra los efectos inhibitorios del enraizamiento típicos de las citocininas. Resultados similares también se encontraron en la etapa de multiplicación *in vitro* de brotes de guayabo, donde al adicionar la adenina o el sulfato de adenina éstos emitieron raíces y el desarrollo de brotes no fue significativo (datos no reportados).

La superioridad de BAP en la inducción de brotes se atribuye a la capacidad de los tejidos vegetales para responder al BAP más rápidamente que a otros reguladores sintéticos, o de inducir la producción de hormonas naturales como la zeatina dentro del tejido (Malik *et al.*,



2005). Otros aditivos del medio de cultivo para mejorar el crecimiento incluyen la sacarosa y el sulfato de adenina (Singh *et al.*, 2002), que tienen efecto significativo en la multiplicación y elongación de brotes.

Aunque en la mayoría de los protocolos de propagación *in vitro* de guayabo, los materiales vegetales muestran una mejor proliferación con el uso de BAP, Biswas *et al.*, (2007) reportaron que el uso en combinación de citocininas como BAP y kinetina (Kin) aumenta la proliferación de brotes axilares a partir de segmentos nodales de guayabo, lo cual se debe al sinergismo de las citocininas; de igual manera, reportan que el número de brotes por explante aumenta significativamente cuando el medio de multiplicación fue enriquecido con sulfato de adenina; así mismo mencionan que la adición de 0.1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, Kin y sulfato de adenina produjo en promedio 6.33 brotes de 3.23 cm de longitud, lo que representa seis veces más brotes que con el uso de las citocininas de manera individual. Por otro lado Singh *et al.*, (2002), cultivaron brotes en medio adicionado con 0.2 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 10 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina, para aumentar el número de brotes de guayabo del cv. 'Allahabad Safeda'. Estos resultados coinciden con lo observado en los cinco genotipos evaluados, que aumentaron significativamente tanto el número como la longitud de los brotes, con la adición de adenina y sulfato de adenina. El uso de sulfato de adenina por sí solo fue reportado por Bantawa *et al.* (2009) en *Picrorhiza scrophulariiflora* Pennel, en donde se mostró una tasa de multiplicación de 3 hasta 18 brotes por explante con 25-100 mg L<sup>-1</sup>; sin embargo la respuesta no cambió al usar bajas (25 mg L<sup>-1</sup>) o altas concentraciones (400 mg L<sup>-1</sup>), sino que fue el sinergismo con otras citocininas lo que condujo a una respuesta favorable. Altas concentraciones de BAP y en general de citocininas (>100 mg L<sup>-1</sup>) provocan que en los nuevos órganos que se forman ocurran anomalías como la generación de callo o el necrosamiento de los tejidos (Singh *et al.*, 2002).

Nandagopal y Kumari (2006) reportaron que el uso de sulfato de adenina en la etapa de multiplicación favoreció el aumento en la longitud de los brotes pasando de 2.66 – 3.50 cm cuando no se usó sulfato de adenina a una longitud promedio de 5.5 y 5.9 cm, en presencia de ese compuesto, obtenidos a partir de callos de *Chichorium intybus* L. cv. Focus. De igual manera encontraron que para esta especie el mayor porcentaje de brotes se produjo con la adición de 1.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AIA y 0.25 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina, lo que coincide con lo reportado para guayabo, donde se recomienda la combinación de citocininas para mejorar la inducción de mayor brotación y aumentar su longitud (Singh *et al.*, 2002 y Biswas *et al.*, 2007).

### **Experimento 3. Enraizamiento**

Se encontraron diferencias altamente significativas para los diferentes genotipos, mientras que para el tipo de auxina se encontró diferencia significativa en las variables número de raíces y porcentaje de enraizamiento, por otro lado la concentración de auxina influyó significativamente solamente sobre la variable % de enraizamiento.

Para cualquier protocolo de micropropagación, un enraizamiento exitoso de brotes es un requisito para facilitar su aclimatación *ex vitro* (Pati *et al.*, 2006). En guayabo, la iniciación de las raíces ha sido estimulada por la incorporación de AIB solo o en combinación con ácido 1-naftalenacético (ANA), aunque se ha logrado la inducción en medio MS solo. (Rai *et al.*, 2010). El tipo y la concentración de los reguladores de crecimiento durante el establecimiento y multiplicación *in vitro*, así como la edad de la planta son factores que influyen en los requerimientos de auxinas en el enraizamiento de guayabo (Ali *et al.*, 2003).

Los diferentes genotipos respondieron de manera diferente de acuerdo al tipo y concentración de la auxina. En la Figura 2.3 se observa que en ausencia de auxinas (testigo) se obtuvieron altos porcentajes de enraizamiento entre 72 y 92 %, excepto para ‘CH.R.G.’

que fue de alrededor del 35%. Estos resultados difieren de los obtenidos por Mishra *et al.*, (2007b) quienes reportan que para el cv. ‘Allahabab Safeda’ no se logró inducir enraizamiento en ausencia de auxinas. El desarrollo de raíces en ausencia de reguladores de crecimiento puede ser debido a la síntesis de auxinas endógenas en cantidades necesarias para su desarrollo; sin embargo, estas concentraciones de auxina varían de acuerdo con el genotipo (Ali *et al.*, 2003; Ocampo y Núñez, 2007).

El porcentaje de enraizamiento, además de ser influido por el genotipo, también es afectado por las condiciones del cultivo (Couprie *et al.*, 2000). Mishra *et al.* (2007a) obtuvieron para el guayabo cv. ‘Pant Prabhart’ un 85 % de brotes enraizados con una combinación de 0.4 mg L<sup>-1</sup> de AIB y 0.2 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

Generalmente el tiempo que se recomienda para hacer el trasplante a suelo es de 28 a 30 días, sin considerar la especie o la longitud de las raíces; sin embargo, esto puede ocasionar daños durante el trasplante e incrementar el estrés, dificultando la aclimatación (Thomas y Schiefelbein, 2001); por ello es importante conocer el tiempo óptimo donde se obtiene el mayor porcentaje de enraizamiento y los explantes tienen el número y longitud de raíces que faciliten su manejo sin afectar su supervivencia *in vivo*. El tiempo requerido para el enraizamiento fue diferente en cada genotipo, y se vio influenciado por el tipo y la concentración de la auxina. En el genotipo ‘17-06’ las raíces empezaron a emerger a partir de los tres días en presencia de AIB en una concentración de 5.9 mg L<sup>-1</sup>, sin alcanzar el 100 % de brotes enraizados; en cambio con el uso de AIA la respuesta fue a los 6 días, siendo la concentración de 3 mg L<sup>-1</sup> con la que alcanzó un 100 % de brotes enraizados en 12 días. Para el genotipo ‘PM6’ la respuesta de la inducción empezó entre 6 y 7 días, siendo el tratamiento de 1.3 mg L<sup>-1</sup> de AIB donde se consiguió 100 % de brotes enraizados a los 11 días (Figura 4). En la Figura 2.5 se observa que en el genotipo ‘CH.R.G.’ los brotes

empezaron a enraizar a los cinco días en una concentración de  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA, siendo el tratamiento de  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB, el único con el que se logró el 100 % de brotes enraizados a los 14 días después de la inducción. El desarrollo de raíces en los brotes del genotipo 'PM12' se dio entre 7 y 8 días para los diferentes tratamientos; sin embargo, en ningún de los tratamientos se alcanzó el 100 % de brotes enraizados, siendo 90 % el más alto en presencia de  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB a los 12 días. El genotipo 'RER' fue el que más tardó en responder a la rizogénesis iniciando entre los 9 y 10 días. El tratamiento de  $1.3 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB fue con el que se obtuvo un mayor porcentaje de brotes formara raíces adventicias (90 %) a los 14 días de iniciados los tratamientos.

La emisión de raíces para los genotipos fue entre 6 y 8 días en promedio con los diferentes tratamientos, con excepción de 'RER', en el que fue entre 9 y 11 días, resultados que no concuerdan con los obtenidos por Mishra *et al.*, (2007b) en donde el desarrollo de las raíces para el cultivar 'Allahabab Safeda' se dio a los 17 días en una concentración de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  ( $49.2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) de AIB y 30 días con una concentración de  $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $123 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ), lo que confirma la importancia del factor genotipo.

La respuesta que tuvieron los genotipos en presencia de AIA y AIB, sugiere que el tiempo de inducción de 24 horas fue suficiente para conseguir buenos resultados, ya que el desarrollo de la raíces se vio afectado por altas concentraciones de auxinas en el medio de cultivo y las raíces estuvieron en contacto por tiempo prolongado, como lo reportan Mishra *et al.*, (2007b) con tiempos de emergencia de raíces mayores de 30 días.

## 2.6 Conclusiones

El uso de polivinilpirrolidona en una concentración de  $500 \text{ mg L}^{-1}$  como antioxidante limitó la pérdida de explantes de guayabo, con un valor máximo de 30 % de explantes con alta fenolización para el genotipo 'PM6', independientemente del tipo de explante utilizado.

Los genotipos tuvieron un comportamiento diferente en las tres fases de su propagación *in vitro* evaluadas y su desarrollo varió de acuerdo con el medio de cultivo y reguladores de crecimiento utilizados.

Durante la fase de multiplicación la adición de  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de bencil amino purina generó mayores coeficientes de multiplicación para los genotipos 'Chapeada redonda grande', 'Paluma12' y 'Paluma 6'.

La adición de precursores de citocininas favoreció el crecimiento y desarrollo de los brotes de los cinco genotipos. Con la adenina en una concentración de  $30 \text{ mg L}^{-1}$  promovió un mayor coeficiente de multiplicación para los genotipos 'PM 6' y 'PM12', mientras que el genotipo '17-06' tuvo una mejor respuesta en  $15 \text{ mg L}^{-1}$ . La adición de sulfato de adenina en una concentración de  $40 \text{ mg L}^{-1}$  aumentó los coeficientes de multiplicación de los genotipos 'CH.R.G' y 'RER'.

La inducción del enraizamiento se logró de manera eficaz con la adición de AIA y AIB durante 24 h. La cinética de enraizamiento mostró que el desarrollo de la raíces fue más rápido  $1.3 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB para los genotipo 'PM6' y 'RER', mientras que para '17-06' la respuesta fue más rápida con  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA y para los genotipo 'CH.R.G' y 'PM12' la concentración de  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB indujo mayor respuesta.

Los resultados obtenidos resaltan la importancia de generar un protocolo de micropropagación para genotipos sobresalientes.

## 2.7 Bibliografía

- Abdelwahd R., N. Hakam, M. Labhilili and S. Udupa (2008)** Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. *African Journal of Biotechnology* 7: 997-1002.
- Ali N., R. M. S. Mulwa, M. A. Norton and R. M. Skirvin (2003)** Micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 78: 739-741.
- Bantawa P., O. S. Roy, P. Ghosh and T. K. Mondal (2009)** Effect of bavistin and adenine sulphate on *in vitro* shoot multiplication of *Picrorhiza scrophulariiflora* Pennell.: an endangered medicinal plant of Indo-China Himalayan regions. *Plant Tissue Culture & Biotechnology* 19: 237-245.
- Biswas B. K., N. Joshee, A. Yadav and A. K. Yadav (2007)** Development and application of biotechnology in guava: a nutraceutical fruit. *Acta Horticulturae* 744: 267-276.
- Carvalho P. G. B., C. M. M. Machado, C. L. Moretti e M. E. N. Fonseca (2006)** Hortaliças como alimentos funcionais. *Horticultura Brasileira* 24: 397-404.
- Chandra R., A. Bajpai, S. Gupta and R.K. Tiwari (2004)** Embryogenesis and plant regeneration from mesocarp of *Psidium guajava* L. (guava). *Indian Journal Biotechnology* 3: 246 – 248.
- Chorilli M., G. R. Leonardi and H. R. N. Salgado (2007)** Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. *Revista Brasileira de Farmácia* 88: 113-118.

**Concepción O., L. Nápoles, A. T. Pérez, M. Hernández, N. Peralta y R. Trujillo (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.

**Coupric I., N. Ollat, J. P. Tandonnet, C. Poizat and J. P. Doazan (2000)** *In vitro*

rhizogenesis aptitudes of the petiole of different grapevine genotypes-comparison with hardwood cuttings. Acta Horticulturae 528: 415-424.

**Giri C. C., B. Shyamkumar and C. Anjaneyulu (2004)** Progress in tissue culture, genetic

transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. Trees 18: 115-135.

**Krishna H. and S. K. Singh (2007)** Biotechnological advances in mango (*Mangifera indica*

L.) and their future implication in crop improvement—a review. Biotechnology Advances 25: 223–243.

**Malik S. K., R. Chaundhury and R. K. Kalia (2005)** Rapid *in vitro* multiplication and

conservation of *Garcinia indica*: a tropical medicinal tree species. Scientia Horticulturae 106: 539-553.

**Mishra M., R. Chandra, R. Pati and A. Bajpai (2007a)** Micropropagation of guava

(*Psidium guajava* L.). Acta Horticulturae 735: 155-158.

**Mishra D. S., J. P. Tiwari and L. Shant (2007b)** *In vitro* cloning of guava (*Psidium guajava*

L.) cv. Pant Prabhat. Acta Horticulturae 735: 127-132.

**Murashige, T. and F. Skoog. (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with

tobacco tissue cultures. Physiologia. Plantarum 15: 473-497.

- Nandagopal S., B. D. R. Kumari (2006)** Adenine sulphate induced high frequency shoot organogenesis in callus and *in vitro* flowering of *Cichorium intybus* L. cv. Focus - a potent medicinal plant. *Acta Agriculturae Slovenica* 87: 415-425.
- Ocampo F. y V. M. Núñez (2007)** Propagación *in vitro* de *Psidium guajaba* mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 8: 22-27.
- Padilla R. J., G. E. González, V. F. Esquivel, S. E. Mercado, D. S. Hernández y P. N. Mayer (2002)** Caracterización de germoplasma sobresaliente de guayabo de la región Calvillo-Cañones, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25(4): 393-399.
- Papadatou P., C. A. Pontikis, E. Ephtimiadou and M. Lydaki (1990)** Rapid multiplication of guava seedlings by *in vitro* shoot tip culture. *Scientia Horticulturae* 45: 99-103.
- Pati P. K., S. P. Rath, M. Sharma, A. Sood and, P. S. Ahuja (2006)** *In vitro* propagation of rose—a review. *Biotechnology Advances* 24: 94-114.
- Pérez A. T., L. Nápoles, O. Concepción y R. Trujillo (2002)** Multiplicación *in vitro* de brotes de guayaba (*Psidium guajava* L.) var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 obtenidos a partir de semillas. *Cultivos Tropicales* 23: 57-61.
- Rai M. K., N. Akhtar, V. S. Jaiswal (2007)** Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. *Scientia Horticulturae* 113: 129 – 133.
- Rai M. K., P. Asthana, V. S. Jaiswal and U. Jaiswal (2010)** Biotechnological advances in guava (*Psidium guajava* L.): recent developments and prospects for further research. *Trees* 24: 1-12.
- SAGARPA.** Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Consultado 15 de octubre de 2014. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/>.



- Singh S. K., P. R. Meghwal, H. C. Sharma and S. P. Singh (2002)** Direct shoot organogenesis on hypocotyl explants from *in vitro* germinated seedlings of *Psidium guajava* L. cv. Allahabad Safeda. *Scientia Horticulturae* 95: 213-221.
- Thomas P. and J. W. Schiefelbein (2001)** Combined *in vitro* and *in vivo* propagation for rapid multiplication of grapevine cv. Arka Neelamani. *HortScience* 36: 1107-1110.
- Van Staden J., C. W. Fennell and N. J. Taylor (2006)** Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae* 725: 55-62.
- Wróblewska K. (2012)** The influence of adenine and benzyladenine on rooting and development of *Fuchsia hybrida* cuttings. *Acta Agrobotanica* 65: 101-108.

**Cuadro 2.1 Efecto promedio de la concentración de bencilaminopurina en la multiplicación *in vitro* de brotes de guayabo de los genotipos Chapeada Roja Grande, PM 12 y PM6, 30 días después de aplicados los tratamientos.**

Tratamiento (genotipo - mg L <sup>-1</sup> )	LBI (mm)	NN	NB	LB (mm)	CM
CH.R.G. - 0.5 (T)	14.3 a†	2.46 a	1.04 c	4.4 c	1.29 ab
CH.R.G. - 1.0	16.7 a	2.83 a	1.37 bc	4.9 abc	1.29 ab
CH.R.G. - 1.5	15.7 a	2.95 a	1.37 bc	5.2 abc	1.21 b
CH.R.G. - 2.0	15.2 a	2.83 a	1.08 c	3.4 c	1.12 b
PM 12 + 0.5 (T)	14.1 a	3.00 a	2.41 a	9.7 ab	2.83 a
PM 12 + 1.0	16.0 a	2.87 a	2.16 ab	8.6 abc	2.21 ab
PM 12 + 1.5	15.0 a	2.66 a	1.87 abc	10.4 a	2.33 ab
PM 12 + 2.0	16.0 a	3.00 a	2.08 ab	8.1 abc	2.08 ab
PM 6 + 0.5 (T)	14.0 a	2.61 a	1.61 abc	9.4 ab	2.05 ab
PM 6 + 1.0	14.3 a	2.77 a	1.94 abc	6.3 abc	1.89 ab
PM 6 + 1.5	13.2 a	2.44 a	1.94 abc	5.6 abc	1.22 b
PM 6 + 2.0	15.1 a	2.72 a	2.17 ab	5.2 abc	1.61 ab
C.V.	12.00	8.18	21.34	34.76	35.64

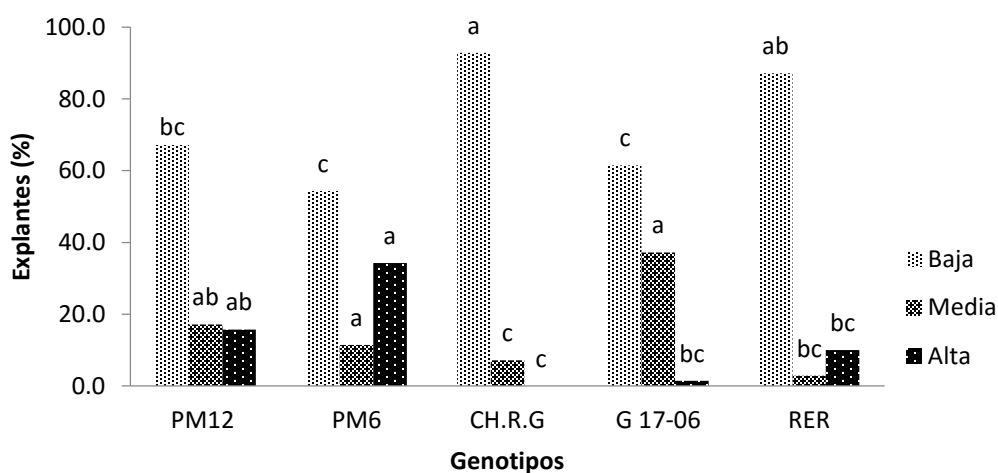
T: testigo; LBI: Longitud del explante inicial; NN: Número de nudos; NB: Número de brotes; LB: Longitud de brotes; CM: Coeficiente de multiplicación; C.V.: Coeficiente de variación. †Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey,0.05).

**Cuadro 2.2 Efecto promedio de la concentración de adenina (A) y sulfato de adenina (S) en la multiplicación *in vitro* de brotes de guayabo de los genotipos PM6, PM12, 17-06, CH.R.G. y RER 30 días después de aplicados los tratamientos.**

Tratamiento (genotipo – precursor - mg L <sup>-1</sup> )	LBI (mm)	NN	NB	LB (mm)	CM
PM6 Test.	14.0 i†	2.61 ij	1.61 efghijk	9.4	2.05 fgh
A 15	28.2	3.77	3.02	11.0	3.31
A 20	26.8	3.45	2.88	9.3	3.22
A 30	25.3	3.48	3.54 a	9.3	3.51
A 40	28.0	3.28	2.57	7.8	2.88
S 15	30.2	3.68	3.14	6.9	2.20
S 20	33.5 a	4.26	1.76	6.1	2.46
S 30	32.4 a	4.34 a	3.05	5.8 fgh	2.65
S 40	30.4 abc	4.07	2.08	8.8	2.65
PM 12 Test.	14.1 i	3.00 ghij	2.41	9.7	2.83
A 15	29.6	3.68	1.88	12.6	2.71
A 20	26.9	3.91 abcd	2.51	14.3	3.25
A 30	29.9 abcd	3.85	3.17	18.0 a	4.31 a
A 40	26.9	3.72	2.96	14.8	3.72
S 15	27.9	3.91 abcd	2.25	13.9	3.25
S 20	25.5	3.60	3.45 ab	14.3	4.22
S 30	26.5	3.88	2.79	14.1	3.74
S 40	26.9	3.77	3.25	15.8	4.14
17-06 Test.	16.0 ghi	2.83 hij	1.83	4.1 gh	1.83 gh
A 15	22.7	3.54	2.40	9.9	2.88
A 20	22.6	3.74	1.99	8.4	2.42
A 30	23.2	3.54	2.00	8.1	2.31
A 40	26.7	3.51	2.00	10.6	2.80
S 15	25.5	3.54	2.17	11.8	2.68
S 20	26.6	3.71	2.54	5.9	2.08
S 30	25.6	3.75	2.10	8.3	2.28
S 40	27.2	3.77	2.28	6.2	2.02
CH.R.G. Test.	14.3 hi	2.46 j	1.04	4.4	1.29 h
A 15	25.9	3.00	1.40	9.2	2.71
A 20	28.0	3.12	1.12	9.2	2.56
A 30	25.2	3.04	1.40	8.0	2.56
A 40	29.6	3.16	0.64 k	4.1 gh	2.36
S 15	27.7	3.31	1.29	8.8	2.58
S 20	27.5	3.04	1.28	7.5	2.68
S 30	28.6	3.12	1.12	7.3	2.40
S 40	31.5 ab	3.32	1.28	9.1	2.76
RER Test.	19.8 fghi	3.46	1.26 hijk	3.1 h	2.26 efgh

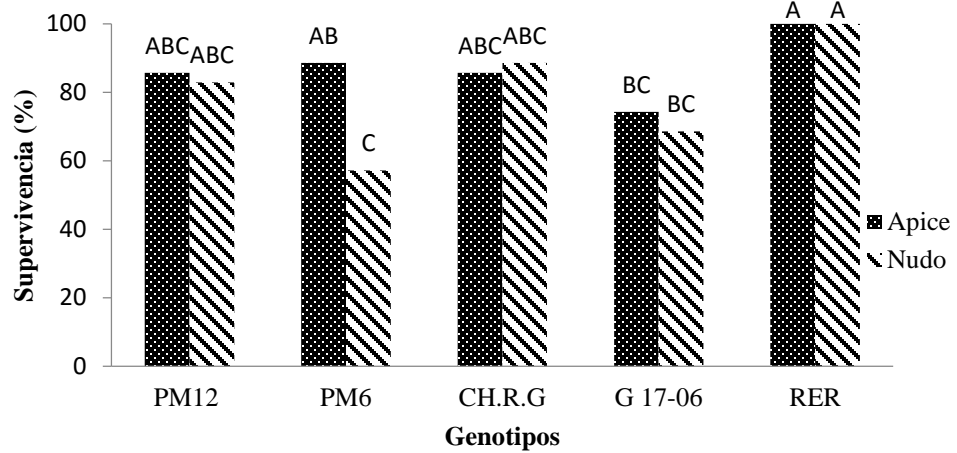
A 15	22.1	3.30	1.40	5.5	2.35
A 20	20.2	3.05	1.95	8.5	2.85
A 30	23.0	3.10	1.35	9.3	3.10
A 40	23.0	3.20	1.45	8.5	3.00
S 15	20.1	3.05 ghij	1.45	10.3	2.85
S 20	23.5	3.30	1.50	7.1	3.20
S 30	23.2	3.25	1.85	8.2	3.20
S 40	21.5	3.20	2.15	10.5	3.40
C.V.	13.21	9.05	26.27	31.86	19.29

Test: Testigo; LBI: Longitud del explante inicial; NN: Número de nudos; NB: Número de brotes; LB: Longitud de brotes; CM: Coeficiente de multiplicación; C.V.: Coeficiente de variación. †Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey,0.05).



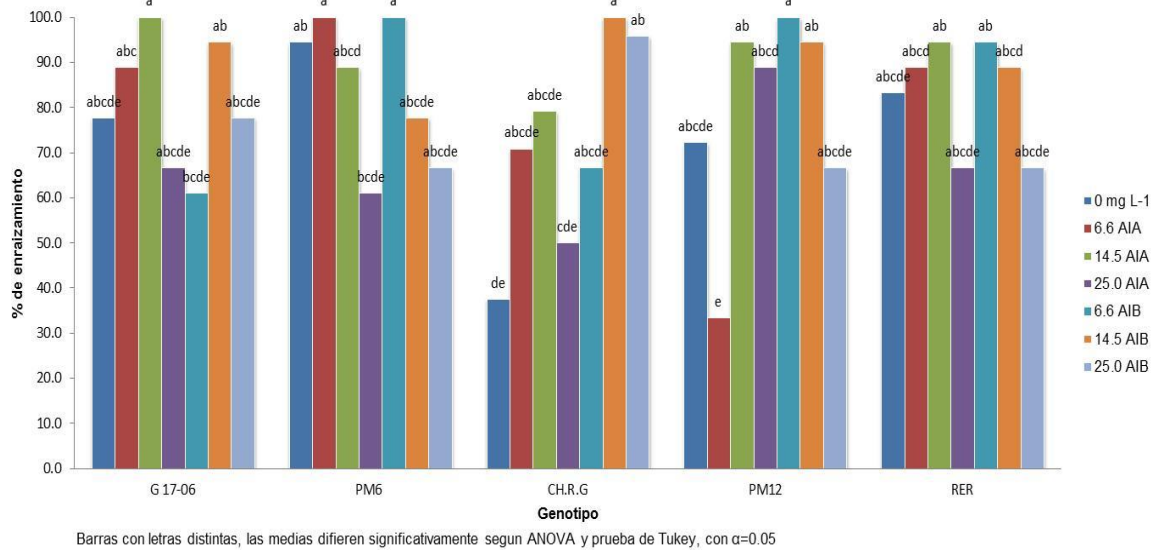
Medias entre genotipos con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey,0.05)

**Figura 2. 1** Porcentaje de explantes con diferentes grados de fenolización de yemas de cinco genotipos de guayabo utilizando PVPP como antioxidante, 10 días después de su establecimiento *in vitro*.

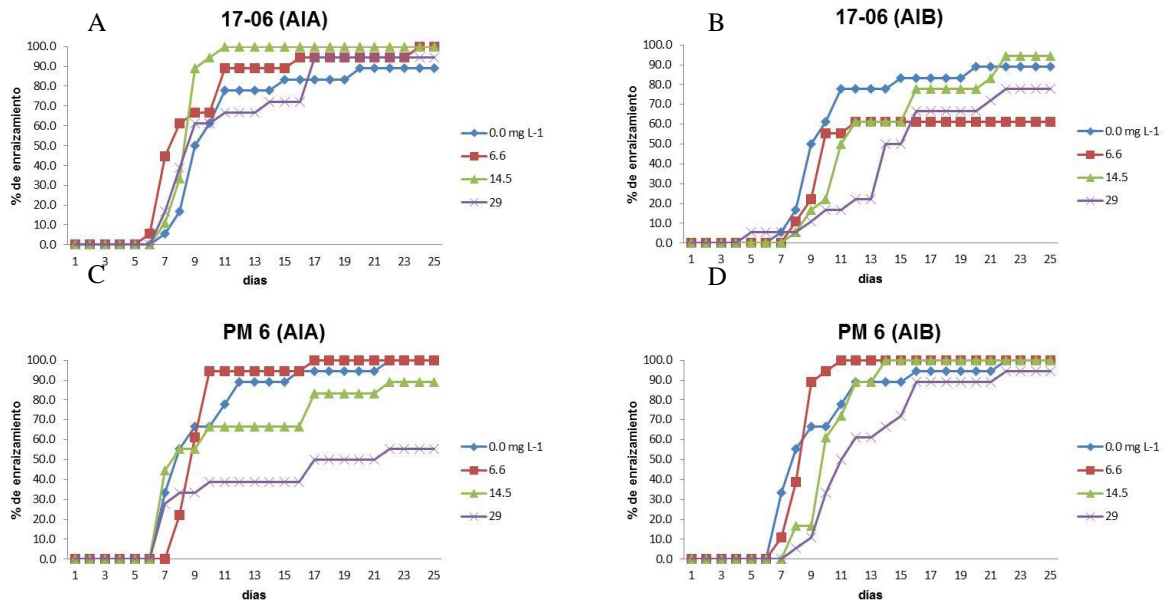


Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey,0.05).

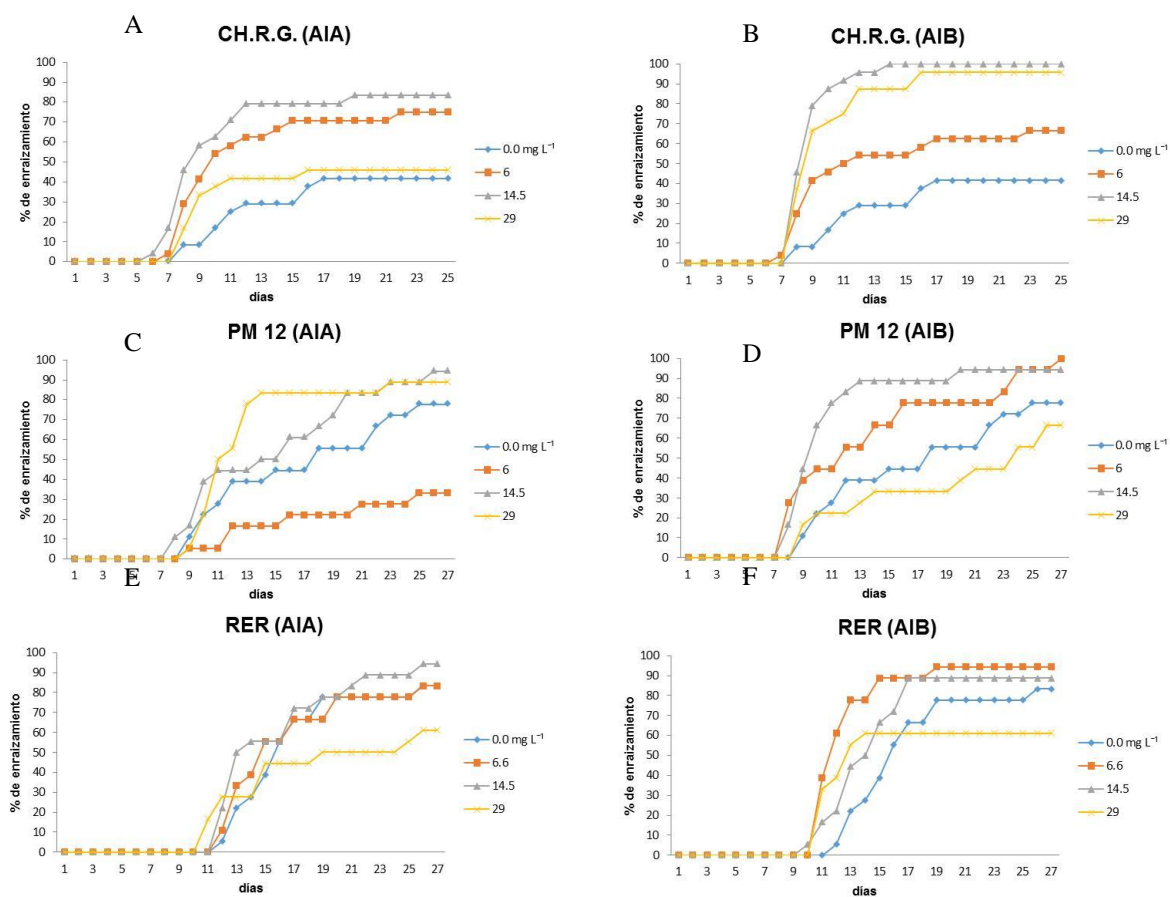
**Figura 2. 2** Porcentaje de supervivencia para dos tipos de explantes de cinco genotipos de guayabo 10 días después de su establecimiento *in vitro*.



**Figura 2. 3** Efecto de la concentración y tipo de auxina sobre el enraizamiento *in vitro* de cinco genotipos de guayabo, 30 días después del inicio de los tratamientos.



**Figura 2.4 Efecto del tipo y concentración de auxina sobre la cinética de enraizamiento de brotes de guayabo de los genotipos 17-06 (A y B) y PM6 (C y D).**



**Figura 2.5** Efecto del tipo y concentración de auxina sobre la cinética de enraizamiento de brotes de guayabo de los genotipos CH.R.G. (A y B), PM12 (C y D) y RER (E y F).

## CAPITULO II

### ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE SELECCIONES DE GUAYABO Y PARIENTES SILVESTRES DEL GÉNERO *Psidium* MEDIANTE MICROSATÉLITES<sup>2</sup>

#### 3.1 RESUMEN

México como centro de origen y con más de un siglo de cultivo del guayabo (*Psidium guajava* L.) presenta una gran variabilidad genética que poco ha sido aprovechada. En este contexto se estudió el grado de diversidad y la estructura genética de 16 selecciones de guayaba cultivada (*Psidium guajava* L.) y cuatro parientes silvestres (*P. sartorianum*, *P. guineense* Swartz (“guayabilla”), *P. fridrichsthalianum* (Berg) Nied y *P. cattleianum*) mediante 18 *loci* de SSR. Se estimó el número de alelos por locus, la proporción de *loci* polimórficos, heterocigosidad esperada y los estadísticos F de Wright. Se realizaron análisis de componentes principales y de conglomerados. Se detectó un total de 139 alelos con un promedio de 7.66 alelos por locus y el 100 % de *loci* polimórficos. *P. sartorianum* presentó el índice de polimorfismo más alto, mientras que *P. cattleianum* fue la de mayor heterocigosidad. Las selecciones ‘Sk. China’ y ‘Pm6’ mostraron una mayor proporción de *loci* polimórficos. Se detectaron 45 alelos exclusivos de algunas poblaciones estudiadas. Los datos arrojan que existe un 36.71 % de diversidad genética intraespecífica y 63.29 % interespecífica. Atendiendo al color de pulpa en el dendograma pueden apreciarse 4 grupos bien definidos. El Grupo 1 de pulpa rosada a roja está formado por los genotipos ‘Sk. China’, ‘Pm 12’, ‘Pm 8’ ‘Sk. Lisa’, ‘Selección 3’. En el Grupo 2 se encuentran los de pulpa blanca a

<sup>2</sup>Manuscrito en preparación para ser enviado para su publicación como artículo científico.



amarilla, donde se ubicaron los genotipos ‘Chapeada redonda grande’, ‘Chapeada China’, ‘Chapeada Firme’, ‘17-06’. El Grupo 3 se integró por las variedades originarias de Cuba ‘Cotorrera’, ‘Enana Roja Cubana’, ‘Enana Blanca Cubana’ o ‘N6’ y por último el Grupo 4 estuvo conformado por las especies de *Psidium* con potencial para portainjertos.

**Palabras clave:** *Psidium guajava* L., *Psidium sartorianum* Berg, *Psidium guineense* Swartz, *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Nied, *Psidium cattleianum* (Sabine), SSR.

### 3.2 Introducción

La familia *Myrtaceae* a la cual pertenece el guayabo, está representada por aproximadamente por 102 géneros y 3000 especies de árboles y arbustos (Manica, 2000). Por su importancia económica destaca el género *Psidium* y las especies más importantes son *P. guajava* L., *P. sartorianum*, *P. guineense* Swartz, *P. friedrichsthalianum* (Berg) Nied, *P. salature*, *P. hypoglacum*, *P. galapageium*, *P. cattleianum* Sabine y *P. cattleianum lucidum* (Mata y Rodríguez, 2000).

La alta variabilidad génica y la heterogeneidad productiva del guayabo en México están asociadas a la propagación sexual de las plantaciones y a la gran diversidad de climas y suelos presentes en los 21 Estados donde se desarrolla como cultivo (Martínez-De Lara *et al.*, 2004; Youssef *et al.*, 2010). La amplitud de la variabilidad entre guayabas cultivadas fue descrita con anterioridad (Laskminarayana y Moreno, 1978), y dicha variabilidad ha sido la base para los programas de mejoramiento genéticos actuales (Sánchez-Teyer *et al.*, 2010).

Estos programas de mejoramiento han tenido magros resultados en México, debido a que no se ha aprovechado la diversidad genética existente en las regiones ecológicas donde se ha venido cultivando por más de un siglo, ya que no existen variedades mejoradas que se

cultiven extensamente y que además presenten ventajas agronómicas que permitan la homogenización de las huertas (Martínez-De Lara *et al.*, 2004).

El uso de marcadores moleculares y su correlación con los fenotipos proporcionan puntos de referencia necesarios para la detección y el análisis de la variación genética (Agarwal *et al.*, 2008), que se ha vuelto una prioridad para la caracterización de germoplasma, y un requisito para programas de mejoramiento más eficaces (Belaj *et al.*, 2003). Risterucci *et al.* (2005) diseñaron cebadores de SSR a partir de diferentes genotipos de guayabo. Estos marcadores han sido de gran utilidad para el desarrollo de estudios de diversidad y la identificación de accesiones en el cultivo (Rueda *et al.*, 2006; Sanabria *et al.*, 2006; Valdés-Infante *et al.*, 2007; Aranguren y Fermín, 2007; Rodríguez *et al.*, 2007; Valdés-Infante *et al.*, 2010a; Risterucci *et al.*, 2010).

Con base en lo anterior el objetivo del presente trabajo fue realizar un análisis de diversidad genética de selecciones de guayaba con potencial productivo y de cuatro parientes silvestres que pueden ser utilizados como portainjertos, además de determinar las relaciones de similitud y filogenéticas entre los diferentes materiales estudiados.

### **3.3 Materiales y Métodos**

#### **Material Genético**

Se estudiaron 163 accesiones, correspondientes a 21 poblaciones de cinco especies del género *Psidium*: *P. guajava* L. “guayabo”, *P. sartorianum* “arrayán” *P. guineense* Swartz “guayabilla”, *P. friedrichsthalianum* (Berg) Nied “cass” y *P. cattleianum* “guayaba fresa”. Dentro de *Psidium guajava* L. fueron estudiados los siguientes genotipos: ‘Paluma 12’ (Pm 12), ‘Paluma 6’ (Pm 6), ‘17-06’, ‘18-06’, ‘Roja Exterior Redonda’ (RER), ‘Roja Chapeada Grande’ (CH.R.G), ‘SK China’, ‘Chapeada China’, ‘Paluma 8’ (Pm 8), ‘Selección 3’, ‘Nayarit’, ‘SK Lisa’, ‘Chapeada Firme’, ‘Cotorrera’, ‘EEA Roja’ y ‘EEA Blanca’. Para *P.*

*cattleianum*, se consideraron dos materiales: fruto rojo y fruto amarillo. Los genotipos de *P. guajava* fueron seleccionados por su potencial en su uso comercial, mientras que especies como *P. friedrichsthalianum* y *P. sartorianum*, son considerados como portainjertos tolerantes al ataque de nematodos (Anexo I).

### **Aislamiento de ADN**

La extracción de ADN se realizó a partir de 100 mg de tejido verde provenientes de hojas (primer par) las cuales se colocaron a -80 °C durante 24 hrs. Se utilizó el kit comercial Charge Switch® gDNA Plant, Invitrogen. La maceración se realizó en tubos Eppendorf con 900 µL de buffer de lisis (Charge Switch® Lysis Buffer), después de macerar el tejido se agregó 100 µL de reactivo A (CaCl<sub>2</sub>, polivinilpirrolidona), 1 µL de RNasa para después tener en agitación durante 15 s, el paso siguiente fue agregar 100 µL de dodecil sulfato de sodio e incubar durante cinco minutos a temperatura ambiente, terminado el tiempo se agregaron 400 µL de buffer de precipitación (Charge Switch® Precipitation Buffer) y se agitó durante 30 s. La separación de las fases fue por centrifugación a 15,000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4° C. Se transfirieron 800 µL del sobrenadante a placas de 96 pozos profundos (Microtiter Deep well plate), las cuales contenían 80 µL de detergente (Charge Switch® 10 % Detergent) y 40 µL de perlas magnéticas. Las muestras fueron procesadas con un robot de extracción (KingFisher™ Flex Magnetic Particle), equipado con tres placas más que contenían buffer de lavado (Charge Switch® Wash Buffer) y una más con 100 µL de buffer de elución (Charge Switch® Elution Buffer) donde fue depositado el ADN. La cantidad y calidad del ADN fue evaluada mediante lecturas de absorbancia 260/280 nm en un espectrofotómetro de ultra-bajo volumen (Nanodrop 2000 Thermo Scientific™).

### **Amplificación por PCR múltiple**

Se usaron 18 iniciadores específicos para guayabo para la amplificación de la PCR (Cuadro 3.1) obtenidos de Risterucci *et al.* (2005), éstos fueron marcados con una etiqueta fluorescente en su extremo 5' con una de las siguientes etiquetas: 6-FAM y HEX (Macrogen). La amplificación de la PCR múltiple fue siguiendo el protocolo indicado por Risterucci *et al.* (2005), en un volumen de 20 µL que contenía 25 ng de ADN molde, 10 pmol de cada iniciador, 1 X de buffer de PCR (Go Taq<sup>®</sup> Reaction Buffer), 200 µM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1 U de *Taq* polimerasa (Promega). El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 94 °C durante 4 min, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 45 s de desnaturalización, 50.4-58 °C por 1 min de alineamiento, y 72 °C por 1 min de extensión con una extensión final de 7 min a una temperatura de 72 °C.

### **Separación y análisis de fragmentos**

Se realizó mediante electroforesis capilar utilizando un secuenciador de ADN (Genetic Analyzer ABI 3130, Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizando Genescan 500 LIZ como marcador estándar (Applied Biosystem). El análisis e identificación de alelos se realizó con el software GeneMapper v.4.0.

**Cuadro 3.1 Loci de microsatélites e iniciadores utilizados para la amplificación de SSRs en genotipos de guayabo.**

Grupo	Locus	Tamaño de fragmento (pb)	Iniciador adelante/ Iniciador reverso
1	mPgCIR237	71 – 111	HEX-AGATTCCATCTGCGATTGT/GCGGATCAAAACCTAATCT
	mPgCIR165	98 – 168	6-FAM-TAAGGGATTCATTTCCGAGT/CTGGTGTGACGATGACTTTT
	mPgCIR18	192 – 204	6-FAM-TAAGCTGCATGTGTGC/ATGGCTTTGGATGAAA
	mPgCIR10	262 – 320	HEX-GTTGGCTCTTATTTTGGT/GCCCCATATCTAGGAAG
2	mPgCIR25	104 – 130	6-FAM-GACAATCCAATCTCACTTT/TGTGTCAAGCATAACCTTC
	mPgCIR99	73 - 119	HEX-TCAAAGTCCAAAACCTCATGC/GGGATGGAGTAAAGATGAAA
	mPgCIR14	184 – 186	6-FAM-TAAACACAACAAGGGTCA/CAGTTTTTCATATCGTCCTC
	mPgCIR23	184 - 198	HEX-GTCTATACCTAATGCTCTGG/CCCAGGAAAATCTATCAC
	mPgCIR94	236 – 262	6-FAM-CAACCTTCCCGTGATTATT/CTAGCTTCTTCAGTGGGAAC
3	mPgCIR09	156 - 176	6-FAM-GCGTGTGCGTATTGTTTC/ATTTTCTTCTGCCTTGTC
	mPgCIR07	148 – 160	HEX-ATGGAGGTAGGTTGATG/CGTAGTAATCGAAGAAATG
	mPgCIR17	230 - 240	HEX-CCTTTCGTCATATTCATT/CATTGGATGGTTGACAT
	mPgCIR08	210 – 224	6-FAM-ACTTTCGGTCTCAACAAG/AGGCTTCTACAAAAGTG
	mPgCIR13	240 – 260	6-FAM-CCTTTTTCCCGACCATTACA/TCGCACTGAGATTTTGTGCT
4	mPgCIR16	268 -296	6-FAM-AATACCAGCAACACCAA/CATCCGTCTCTAAACCTC
	mPgCIR19	258 – 280	HEX-AAAATCCTGAAGACGAAC/TATCAGAGGCTTGCATTA
	mPgCIR21	150 - 164	HEX-TGCCCTTCTAAGTATAACAG/AGCTACAAACCTTCCTAAA
5	mPgCIR161	240 - 262	HEX-TCTCAAGGACCAACAAGAAG/AGGACTTAGCTTGGGTTTTTC

## **Análisis estadístico**

Se registraron los diferentes alelos detectados en cada individuo para cada locus, con el objetivo de obtener las frecuencias alélicas poblacionales, y se determinaron parámetros de diversidad, como el número de alelos por locus, alelos exclusivos, proporción de *loci* polimórficos, índice de heterocigosidad esperada, así como la estructura genética de las poblaciones, estimada mediante los estadísticos de F de Wright (1965), que describen el grado de los efectos de endogamia de una población subdividida ( $F_{IT}$ ), entre el componente debido al apareamiento no aleatorio dentro de poblaciones ( $F_{IS}$ ) y la subdivisión entre poblaciones ( $F_{ST}$ ). Para estimar estos parámetros se utilizó el programa POPGENE 1.32 (Yeh *et al.*, 1999).

Se realizó un análisis de conglomerados entre poblaciones, aplicando el método de agrupamiento Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) mediante el programa NTSYSpc V2.21o (Rohlf, 2009), empleando la matriz de distancias genéticas de Nei (1972), para definir las relaciones de similitud entre los distintos genotipos de guayaba. Por otro lado, se realizó un análisis de componentes principales con base en las frecuencias alélicas utilizando el paquete SAS V.9.0. (SAS Institute, 2002), para detectar los alelos que tienen una mayor contribución en la diferenciación de las poblaciones de guayabo.

### **3.4 Resultados y Discusión**

#### **Análisis de diversidad**

En el conjunto de poblaciones se obtuvo un total de 139 alelos en los 18 *loci* analizados; todos ellos fueron polimórficos para el conjunto de los 163 accesiones, con un promedio de 7.66 alelos por locus.

El genotipo '18-06' fue el menos polimórfico (5.56 %) debido principalmente a las pocas accesiones disponibles para su análisis, seguida por el genotipo Catley Rojo (27.78 %),

mientras que los genotipo ‘SK. China’ y ‘Pm 6’ fueron los que mayor polimorfismo presentaron con 88.89 % y 77.78 %, respectivamente, lo que sugiere una mayor diversidad para estos genotipos (Cuadro 3.2). *Psidium sartorianum* fue la especie de los portainjertos que presentó una mayor diversidad con un polimorfismo de 61.1 %, mientras que *Psidium guinnense* con 9 alelos resultó ser la especie con mayor número de alelos exclusivos. El número de alelos varía desde dos para el locus *mPgCIR07* hasta 14 en *mPgCIR237*, los tamaños de los alelos encontrados varió desde 75 pb para el locus *mPgCIR237* hasta 320 pb para el locus *mPgCIR10*.

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Briceño *et al.* (2010) que con un análisis de 16 loci de SSR obtuvo un total de 43 alelos en 10 especies diferentes de Mirtaceas, lo que indica la necesidad de emplear un gran número de individuos por especie para hacer más robustas las inferencias relacionadas con la variación dentro y entre especies. Por otro lado Valdés-Infante *et al.* (2010b) al analizar 14 especies diferentes de Mirtaceas con cuatro pares de iniciadores de SSR encontraron un total de 52 alelos, con un promedio de 13 alelos por locus; de igual manera, mencionan que aunque la amplificación cruzada con otras especies de Mirtaceas reveló patrones SSR confiables, estas amplificaciones fueron menores en las especies *P. salutare* y *P. araca* presentando sólo un producto de PCR, mientras que para *P. friedrichsthalianum* observaron de uno a dos alelos por locus. En el mismo tenor Risterucci *et al.* (2005) al realizar un análisis de 25 loci de SSR sólo detectaron alelos para 8 pares de iniciadores entre uno a 7 alelos por locus para la especie *P. cattleianum*, mientras que para *P. friedrichsthalianum* sólo encontraron alelos para siete pares de iniciadores, con presencia de entre uno y dos alelos por locus, resultados que difieren de los encontrados en la presente investigación, pues de los 18 loci de SSR se detectaron un total de 24 y 30 alelos para 14 y 13 iniciadores en *P. cattleianum* y *P. friedrichsthalianum*, respectivamente. Al analizar material originario de México Sánchez-Teyer *et al.* (2010) evaluaron 57 accesiones de

guayabo colectadas y seis iniciadores de SSR, donde obtuvieron un total de 79 alelos y un promedio de 13 alelos por locus, siendo el iniciador *mPgCIR161* el que mayor nivel heterocigosidad presentó.

**Cuadro 3.2 Parámetros de diversidad de 16 genotipos de *Psidium guajava*, *P. friedrichsthalianum* (cass), *P. sartorianum*, (arrayán) *P. cattleianum* (catley) y *P. guinnense* (guayabilla) con base en 18 loci de SSR.**

Población	Núm. de accesiones	Número de alelos	Alelos por locus	Alelos exclusivos	% de loci polimórficos	He
CH.R.G	14	30	1.72	1	55.56	0.281
SK.china	16	39	2.16	0	88.89	0.435
Pm12	5	30	1.66	0	61.11	0.341
Pm8	1	27	1.50	2	50.00	0.500
Pm6	7	40	2.22	1	77.78	0.417
Cass	34	24	1.71	2	38.89	0.238
Arrayan	22	30	2.30	5	61.11	0.382
Ch. china	3	25	1.56	0	50.00	0.343
Ch. firme	2	21	1.50	1	33.33	0.309
Selección 3	6	35	1.94	0	66.67	0.459
17-06	8	40	2.22	4	72.22	0.361
18-06	2	5	1.25	2	5.56	0.166
Nayarit	8	50	2.94	7	77.78	0.420
RER	3	40	2.22	1	77.78	0.474
Sk. Lisa	2	28	1.55	0	55.56	0.444
Guayabilla	2	24	1.71	9	55.56	0.440
Catley amarillo	6	17	1.88	6	44.44	0.465
Catley rojo	5	15	1.50	0	27.78	0.266
Cotorrera	3	28	1.55	4	50.00	0.281
Enana Roja	7	30	1.66	1	61.11	0.332
Enana Blanca	7	26	1.44	1	38.89	0.212
Total	163	139	7.66	45	100	

He: Heterocigosidad esperada

El uso de marcadores moleculares dentro en diferentes especies del mismo género es un hecho que ha sido confirmado en diferentes estudios, pueden ser transferidos ya sea entre



especies del mismo género (Valdés-Infante *et al.*, 2009) o de diferentes géneros (Roa *et al.*, 2000; Rai *et al.*, 2013), lo cual es una consecuencia del grado de homología que existe entre las regiones genómicas que flanquean los *loci* de SSR (Briceño *et al.*, 2010).

### **Diferenciación Genética entre poblaciones de guayaba**

Para el análisis de la complejidad y organización de la variabilidad entre las poblaciones, es determinada por los estadísticos F de Wrigth (1978), las accesiones se dividieron en tres grupos: 1) los portainjertos donde se incluyen *P. friedrichsthalianum* (cass), *P. sartorianum*, (arrayán) *P. cattleianum* (catley) y *P. guinnense*; 2) los genotipos de *P. guajava* con pulpa blanca y 3) aquellos que poseen pulpa de color rosa o roja. De acuerdo con los estadísticos de F de Wrigth se muestra que las poblaciones dentro de los grupos no están en equilibrio de Hardy-Weinberg, ya que los valores del coeficiente  $F_{IS}$  indican un exceso de heterocigotos, sobre todo en los portainjertos ya que presentan los valores más negativos (-0.6426) (Cuadro 3.3), y en menor grado en los genotipos de pulpa blanca (-0.3103), de igual manera los genotipos de pulpa blanca presentaron los valores más altos de  $F_{IT}$  (0.5188) y  $F_{ST}$  (0.6327) lo que sugiere una mayor diferenciación y un reducido flujo genético entre las poblaciones. De acuerdo al criterio de Snyder *et al.* (1985), los tres grupos de poblaciones presentaron una muy alta diferenciación genética ( $F_{ST}$  mayor a 0.25), indicando que existe una alta diferenciación entre las colectas de cada grupo y un reducido flujo genético entre ellas y con un valor general para los tres grupos de 0.6329. Con base en los resultados se infiere que el 36.71 % de la variación se encuentra dentro de las colectas y un 63.29 % entre ellas. Los valores elevados de  $F_{ST}$  encontrados pueden deberse al fenómeno de deriva genética tal como lo mencionan Piñero *et al.* (2008), en cuanto mayor haya sido la deriva genética, mayor será la varianza en las frecuencias alélicas entre poblaciones ( $F_{ST}$ ). En los estudios donde se contempla una menor área geográfica se puede esperar menor diferenciación medida como  $F_{ST}$  que en estudios que abarcan un área muy grande. (Piñero

*et al.*, 2008). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos, ya que aun siendo genotipos seleccionados en México el origen de las poblaciones estudiadas es muy distante, encontrando poblaciones provenientes de México, Brasil y Cuba.

**Cuadro 3.3 Estadísticos de F calculados a partir de 18 loci de microsatélites para tres grupos de guayaba.**

<b>Grupo</b>	<b>F<sub>IS</sub></b>	<b>F<sub>IT</sub></b>	<b>F<sub>ST</sub></b>
<b>Portainjertos</b>	-0.6426	0.3657	0.6139
<b>Genotipos de pulpa blanca</b>	-0.3103	0.5188	0.6327
<b>Genotipos de pulpa de color (rosa, roja)</b>	-0.4854	0.0979	0.3927
<b>General</b>	-0.4526	0.4667	0.6329

F<sub>IS</sub>: Endogamia dentro de las poblaciones; F<sub>IT</sub>: Endogamia dentro de la población entera; F<sub>ST</sub>: Endogamia entre subpoblaciones.

### **Relaciones entre las poblaciones.**

Se realizó un análisis de componentes principales (CP) con base en la matriz de correlaciones de frecuencias alélicas de cada población a partir de los 139 alelos. El 80.1 % de la varianza total fue explicada con los primeros 10 CP; el CP1 explica el 14.8 de la varianza total, mientras que el CP2 explica un 10.7 % (Cuadro 3.4).

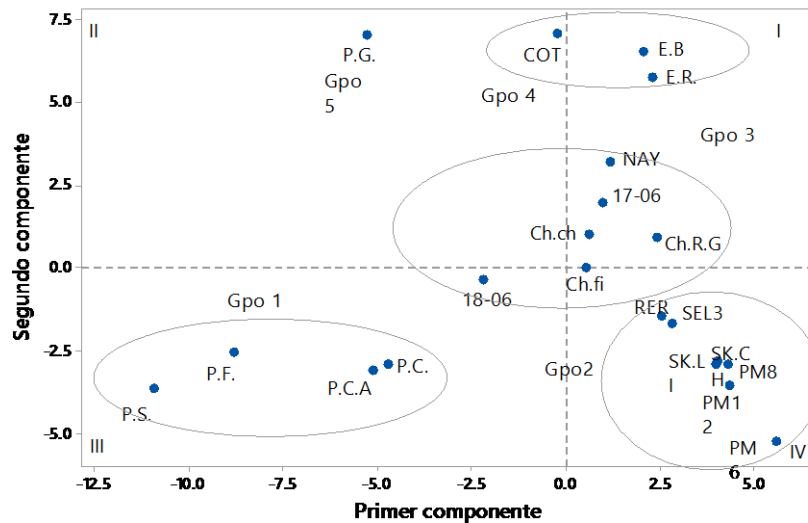
Los alelos que influyeron de manera más importante en la conformación de CP1 fueron *mPgCIR94\_H*, *mPgCIR14\_A*, *mPgCIR17\_F*, *mPgCIR07\_B*, *mPgCIR09\_F*, *mPgCIR161\_E*, *mPgCIR23\_A*, *mPgCIR165\_K*, mientras que en el CP2 los principales contribuyentes fueron los alelos *mPgCIR16\_H*, *mPgCIR237\_B*, *mPgCIR99\_C*, *mPgCIR165\_F*, *mPgCIR161\_C* y *mPgCIR21\_G*.

**Cuadro 1.4 Valores propios y proporción de varianza explicada de los 10 primeros componentes principales generados a partir de los 139 alelos de 18 loci de SSR en 163 accesiones del género *Psidium***

CP	Valores Propios	Porción de varianza	Varianza Acumulada
1	20.59	0.148	0.148
2	14.98	0.107	0.255
3	14.31	0.103	0.358
4	13.38	0.096	0.455
5	12.32	0.088	0.543
6	10.05	0.072	0.616
7	7.75	0.055	0.672
8	6.91	0.049	0.721
9	5.89	0.042	0.764
10	5.23	0.037	0.801

La dispersión de la poblaciones en un plano cartesiano, definido por el CP1 y CP2 mostro variación amplia, con distribución de las poblaciones en los cuatro cuadrantes, identificando seis grupos. El Grupo 1 estuvo conformado por las especies *P. sartorianum*, *P. friedrichsthalianum* y *P. cattleianum*, ubicadas en el Cuadrante III, mientras que el Grupo 2 lo conformaron los genotipos que se caracterizan por tener pulpa de color rojo, con excepción de los genotipos ‘Pm 6’ y ‘RER’ que sólo presentan epidermis con coloraciones rojizas, las cuales se ubicaron en la parte inferior del Cuadrante IV, entre los Cuadrantes I y III se localizó el Grupo 3, constituido principalmente por las poblaciones que comparten la característica de tener pulpa blanca, con excepción del genotipo ‘Nayarit’, mientras que el Grupo 4 se distribuyó en los Cuadrantes I y II y estuvo constituido por los genotipos

cubanos, y por último la especie *P. guinnense* que quedó aislada en el Cuadrante II, conformando un grupo individual (Figura 3.1).

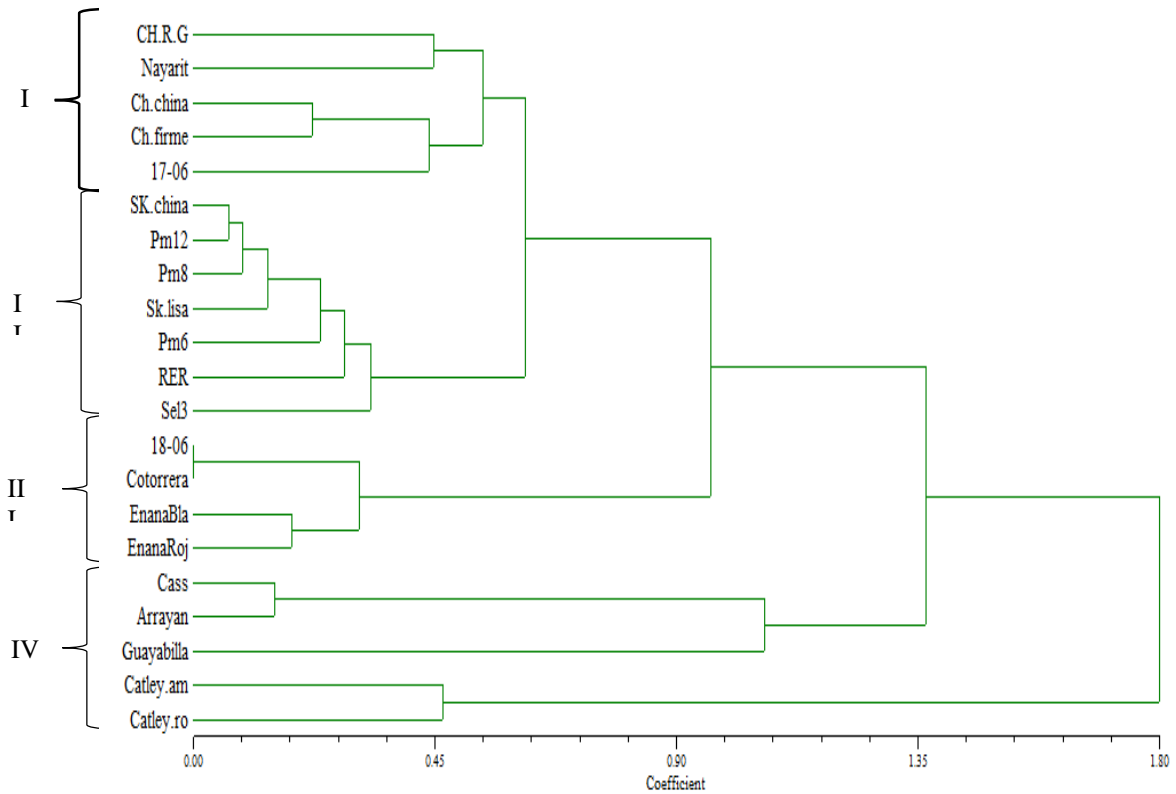


**Figura 3. 1** Dispersión de 21 poblaciones de *Psidium* con base en los dos primeros componentes principales, derivados de 139 alelos de 18 loci de SSR (PS: *P. sartorianum*, PF: *P. friedrichsthalianum*, PC: *P. cattleianum*, PG: *P. guinnense*, COT: cotorrera, EB: enana blanca cubana, ER: enana roja cubana, NAY: Nayarit, Chch: chapeada china, Chfi: chapeada firme, RER: roja exterior redonda, SKL: SK lisa, SKCH: SK china).

En el dendrograma (Figura 3.2) generado a partir de 139 alelos de SSR, se observan cuatro grupos principales, mostrando un agrupamiento similar a los derivados del análisis de componentes principales. Algunas de las diferencias de la agrupación se encuentra en el Grupo I donde se puede observar que el genotipo ‘18-06’ fue asociado con los genotipos de origen cubano (Grupo III) y no con aquellos que presentan una coloración de pulpa blanca.

Otra diferencia es que la población de *P. guinnense* conformo junto con las otras tres especies de *Psidium* el Grupo IV, lo cual contrasta con los resultados obtenidos por Valdés-Infante *et al.* (2010b) donde detectaron una asociación entre el material ‘Enana Roja Cubana’ y *P. guinnense* por ser materiales de porte bajo, sin embargo esta asociación está

basada en sólo cuatro pares de iniciadores. El Grupo II coincide con el agrupamiento del análisis de conglomerados, constituido por los genotipos de pulpa rosada a roja.



**Figura 3. 2 Dendrograma de 21 poblaciones de *Psidium* con base en 139 alelos de SSR, usando la distancia de Nei (1972) y el método de agrupamiento UPGMA.**

### 3.5 Conclusiones

Los materiales de pulpa blanca mostraron una mayor diversidad genética con respecto a loci polimórficos (100 %) en comparación con los otros grupos de poblaciones de guayaba.

Se detectaron 139 alelos generados a partir de 18 loci de SSR, con un promedio de 7.66 alelos por locus, un 100 % de locus polimórficos. Se determinó que el 36.71 % de la variación total es intrapoblacional y el 63.29 % interpoblacional, lo cual puede explicarse por la deriva genética que hay entre ellas por sus lugares de origen.

Se observaron grupos definidos de las poblaciones de guayabo, los materiales de pulpa blanca tendieron a agruparse, con excepción del genotipo '18-06' que conformó un grupo con los genotipos de origen cubano.

Los loci de SSR evaluados tienen potencial de amplificación en representantes del género *Psidium*, permitiendo identificar una gran diversidad de alelos.

### 3.6 Literatura Citada

Agarwal M., N. Shrivastava and H. Padh. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* 27: 617-631.

Aranguren Y., A. Briceño and G. Fermin. 2010. Assessment of the variability of Venezuelan guava landraces by microsatellites. *Acta Horticulturae* 849:147-154.

Belaj A., Z. Satovic, G. Cipriani, L. Baldoni, R. Testolin, L. Rallo and I. Trujillo. 2003. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theoretical and Applied Genetics* 107:736-744.

Briceño A., Y. Aranguren and G. Fermin .2010. Assessment of guava-derived SSR markers for the molecular characterization of *Myrtaceae* from different ecosystems in Venezuela. *Acta Horticulturae* 849: 139-146.

Lakshminarayana S. y M. A. Moreno R. 1978. Estudio preliminar para determinar la existencia de las variaciones en guayaba mexicana. *Revista Chapingo* 10:37-47.

Manica I. 2000. Taxonomía a goiabeira. *In: Fruticultura Tropical, Goiaba*. Manica, I. (ed.). Ed. Cinco Continentes, LTDA.. Porto Alegre, Brasil. pp: 23-36.

Martínez-De Lara. J., M. C. Barrientos L., A. C. Reyes-De Anda, S. Hernández-Delgado, J. S. Padilla-Ramírez y N. Mayek P. 2004. Diversidad fenotípica y genética en huertas de guayabo de Calvillo, Aguascalientes. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27: 243-249.

- Mata B., I. y A. Rodríguez M. 2000. Cultivo y Producción del Guayabo. Ed. Trillas. México, D.F. 160 p.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106: 283-292.
- Piñero D., A. Barahona, L. Eguiarte, A. Rocha O. y R. Salas L. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. *In: Capital Natural de México Vol I: Conocimiento Actual de la Biodiversidad*. CONABIO. México, D.F. pp: 415–435.
- Rai M. K., M. Phulwaria and N. S. Shekhawat. 2013. Transferability of simple sequence repeat (SSR) markers developed in guava (*Psidium guajava* L.) to four Myrtaceae species. *Molecular Biology Reports* 40: 5067–5071.
- Risterucci A. M., M. F. Duval, W. Rohde, and N. Billotte. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. *Molecular Ecology Notes* 5:745-748.
- Risterucci A. M., G. Nansot, R. Grangeon, V. Lepitre, A. de Reeper, X. Argout, M. Ruiz and N. Billotte. 2010. Development of guava microsatellite (SSR) markers using the SAT software. *Acta Horticulturae* 849:113-120.
- Roa A. C., P. Chavarriaga-Aguirre, M. C. Duque, M. M. Maya, M. W. Bonierbale, C. Iglesias and J. Tohme. 2000. Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. *American Journal of Botany* 87:1647-1655.
- Rodríguez N., J. Valdés-Infante, D. Becker, B. Velázquez, G. González, D. Sourd, J. Rodríguez, N. Billotte, A. M. Risterucci, E. Ritter and W. Rohde. 2007. Characterization of guava accessions by SSR markers, extension of the molecular linkage map, and mapping of QTLs for vegetative and reproductive characters. *Acta Horticulturae* 735: 201–216.

- Rohlf, F. L. 2009. NTSYSpc: numerical taxonomy system. Version 2.21o. Exeter Software: Setauket: New York.
- Rueda A., J. D. Palacio, J. E. Muñoz, R. Saavedra y E. Bravo. 2006. Caracterización molecular del banco de germoplasma de guayaba *Psidium* spp. del Centro de Investigación Corpoica-Palmira. Fitotecnia Colombiana 6: 26-32.
- Sanabria H. L., M. A. García, J. E. Muñoz y H. A. Díaz. 2006. Caracterización molecular con marcadores RAM de árboles nativos de *Psidium guajava* (guayaba) en el Valle del Cauca. Acta Agronómica 55:23-30.
- Sánchez-Teyer L. F., A. Barraza-Morales, L. Keb, F. Barredo, A. Quiroz-Moreno, A. O'Connor-Sánchez and J. S. Padilla-Ramírez. 2010. Assessment of genetic diversity of Mexican guava germplasm using DNA molecular markers. Acta Horticulturae 849:133-138.
- SAS Institute. 2002. SAS/STAT User's Guide, Software versión 9.0. SAS Institute Inc. Cary, N. C., USA. 4424 p.
- Snyder L. A., D. Freifelder, y D. L. Hartl. 1985. General Genetics. Jones & Bartlett Publishers. Boston, MA. 650 p.
- Valdés-Infante J., N. N. Rodríguez, D. Becker, B. Velázquez, D. Sourd, G. Espinosa and W. Rohde. 2007. Microsatellite characterization of guava (*Psidium guajava* L.) germplasm collection in Cuba. Cultivos Tropicales 28: 61-67.
- Valdés-Infante H. J., N. N. Rodríguez M., M. Bautista A., M. M. Ortiz G., A. Quiroz M., L. F. Sánchez T., A. M. Risterucci y W. Rohde. 2009. Amplificación cruzada de secuencias simples repetidas de guayabo (*Psidium guajava* L.) en otros representantes de Myrtaceae. *Revista CitriFrut* 26: 15–21.
- Valdés-Infante J., N. N. Rodríguez-Medina, B. Velásquez, D. Rivero, F. Martínez, A.-M. Risterucci, N. Billotte, D. Becker, E. Ritter and W. Rohde .2010a. Comparison of



- the polymorphism level, discriminating capacity and informativeness of morpho-agronomic traits and molecular markers in guava (*Psidium guajava* L.). *Acta Horticulturae* 849: 121-132.
- Valdés-Infante H. J., N. N. Rodríguez M., M. Bautista A., M. M. Ortiz G. A. Quiroz M., L. F. Sánchez T., A. M. Risterucci y W. Rohde. 2010b. Microsatélites desarrollados en guayabo (*Psidium guajava* L.) y su utilidad para evaluar diversidad en la familia Myrtaceae. *Revista Colombiana de Biotecnología* XII:64-76.
- Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.
- Wright S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 4. Variability within and among Natural Populations.* University of Chicago Press. Chicago, IL, USA. 590 p.
- Yeh F. C., R.-C. Yang and T. Boyle. 1999. POPGENE Version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick User Guide. University of Alberta and Centre for International Forestry Research. Edmonton, Canada. Disponible en: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene.pdf>
- Youssef M. A., M. R. El-Helw, A. S. Taghian, and H. M. El-Aref. 2010. Improvement of *Psidium guajava* L. using micropropagation. *Acta Horticulturae* 849: 223–230.

## CONCLUSIONES GENERALES

Los genotipos de guayabo tuvieron un comportamiento diferente en las tres fases de su propagación *in vitro* evaluadas y su desarrollo varió de acuerdo con el medio de cultivo y reguladores de crecimiento utilizados, lo cual resalta la importancia de generar protocolos de micropropagación individuales para genotipos sobresalientes.

El uso de PVPP como agente antioxidante limitó la pérdida de explantes de guayabo durante su establecimiento, sin importar el tipo de explante utilizado, con un máximo de 30 % de explantes con alta fenolización para el genotipo 'Pm 6'.

La adición de precursores de citocininas como el sulfato de adenina y adenina favoreció el crecimiento y desarrollo de los brotes para los diferentes genotipos. Los genotipos 'Pm 6', 'Pm 12' y '17-06' tuvieron una mejor respuesta a la adición de adenina, mientras que los genotipos 'CH.R.G.' y 'RER' aumentó los coeficientes de multiplicación con la adición de sulfato de adenina.

La inducción de la rizogénesis se logró de manera eficaz con la adición de AIA y AIB durante 24 h en el medio de cultivo. Los genotipos tuvieron una respuesta diferente al tipo de auxina así como a la concentración de estas, siendo los genotipos 'Pm 6', 'RER', 'CH.R.G.' y 'Pm 12' los que mostraron un desarrollo de raíces más rápido cuando se añadió AIB, mientras que el genotipo '17-06' fue más rápida con la adición de AIA.

El análisis molecular permitió detectar una amplia diversidad genética entre poblaciones de guayabo, contabilizándose 139 alelos a partir de 18 loci de SSR, con un promedio de 7.66 alelos por locus y un 100 % de loci polimórficos. De la diversidad genética observada se determinó que el 36.71 % de la variación total es intrapoblacional y el 63.29 interpoblacional, lo cual puede explicarse por la deriva genética que hay entre las poblaciones debido a sus lugares de origen. Se observaron grupos definidos atendiendo al color de pulpa, apreciando cuatro grupos bien definidos dentro del dendograma. El Grupo 1 estuvo constituido por genotipos de pulpa rodada a roja, el Grupo 2 se encontraron los de pulpa blanca a amarilla, mientras en el Grupo 3 estuvo integrado por las variedades de origen cubano y por último las especies de *Psidium* con potencial para portainjertos conformaron el Grupo 4.

Los loci de SSR evaluados fueron diseñados especialmente para guayabo; sin embargo, mostraron un potencial de amplificación en otros representantes del género *Psidium* permitiendo identificar una gran diversidad de alelos.

## ANEXO I

**Cuadro A.1** Características de 16 selecciones de guayaba y cuatro especies de *Psidium*.

<b>Genotipo</b>	<b>Propósito</b> (consumo)	<b>Maduración</b>	<b>Color pulpa</b>	<b>Lugar de colecta</b>	<b>Características</b>
<b>SK China</b>	Fresco	Amarilla, epidermis rugosa	Roja	Vitoria de la Conquista Brasil	Peso de fruto mayor de 250g, firme, no caída en precosecha, no presencia de peca
<b>Sk Lisa</b>	Fresco	Amarilla, epidermis lisa	Roja	Vitoria de la Conquista Brasil	Peso de fruto mayor de 250g, firme, no caída en precosecha, no presencia de peca
<b>Pm 6</b> (Kumagay)	Industria	Amarilla, epidermis lisa	Blanca	Vitoria de la Conquista Brasil	Peso de fruto mayor de 250g, firme, no caída en precosecha, no presencia de peca, estándares de Acidez entre 1.5 y 3.5 %
<b>Pm 12</b>	Industria	Amarilla, epidermis lisa	Rosada	Vitoria de la Conquista Brasil	Peso de fruto mayor de 250g, firme, no caída en precosecha, no presencia de peca, estándares de acidez entre 1.5 y 3.5 %
<b>Pm 8</b>	Industria y fresco	Amarilla, epidermis lisa	Rosada	Vitoria de la Conquista Brasil	Peso de fruto mayor de 250g, firme, no caída en precosecha, no presencia de peca, estándares de Acidez entre 1.5 y 3.5 %

**Cuadro A.1** Características de 16 selecciones de guayaba y cuatro especies de *Psidium*.

<b>Genotipo</b>	<b>Propósito (consumo)</b>	<b>Maduración</b>	<b>Color pulpa</b>	<b>Lugar de colecta</b>	<b>Características</b>
<b>RER</b>	Fresco	Epidermis chapeada	Blanca	Cerro colorado, Michoacán	Peso de fruto menor de 150g, firme, no caída en precosecha, sólidos solubles totales mayor a 12 %.
<b>CH.R.G.</b>	Fresco	Epidermis chapeada	Blanca	Jungapeo, Michoacán	Peso de fruto menor de 150g, firme, no caída en precosecha, sólidos solubles totales mayor a 12 %.
<b>Chapeada china</b>	Fresco	Epidermis rojiza y rugosa	Blanca	Jungapeo, Michoacán	Escaza firmeza y bajo porcentaje de caída en precosecha. Peso de fruto menor de 150g., sólidos solubles totales 10 %.
<b>Chapeada firme</b>	Fresco	Epidermis amarilla	Blanca	Jungapeo, Michoacán	Peso de fruto mayor a 150g, firme, no caída en precosecha, sólidos solubles totales mayor a 12 %.
<b>Enana roja cubana</b>	Fresco e industrial	Amarilla, epidermis rugosa	Roja	Ciego de Ávila, Cuba	Peso de fruto mayor de 250g, firme, no caída en precosecha, no presencia de peca, sólidos solubles totales 10 %.
<b>Enana blanca Cubana (N6)</b>	Fresco e industrial	Amarilla y lisa	Blanca	Ciego de Ávila, Cuba	Peso de fruto de 100 a 250g, firme, no caída en precosecha, no presencia de peca, Sólidos Solubles Totales 11.55 % y el 30 % de frutos sin semilla.

**Cuadro A.1** Características de 16 selecciones de guayaba y cuatro especies de *Psidium*.

<b>Genotipo</b>	<b>Propósito (consumo)</b>	<b>Maduración</b>	<b>Color pulpa</b>	<b>Lugar de colecta</b>	<b>Características</b>
<b>Cotorrera</b>	Portainjerto, fresco e industrial	Amarilla	Blanca, amarillo, rosada y roja	Ciego de Ávila, Cuba	Peso de fruto menor a los 100g, firme, con abundante semilla, hasta 500 semilla por fruto, muy rica en vitamina C.
<b>17-06</b>	Fresco	Amarilla, epidermis lisa	Blanca	Vicente Guerrero, Campeche	Peso de fruto mayor de 250g, firme y de poca semilla.
<b>18-06</b>	Fresco	Amarilla, epidermis lisa	Blanca	Vicente Guerrero, Campeche	Peso de fruto menor a los 150 g, firme, de forma aperada y poca semilla.
<b>Selección 3</b>	Fresco e industrial	Amarilla y media china	Roja	Tabasco, Zacatecas	Peso de fruto mayor de 250g, firme, no caída en precosecha y abundante semilla.
<b>Tipo Nayarit</b>	Portainjerto	Amarilla	Rosada	Rosa Morada, Nayarit	Peso de fruto menor de 150g, planta resistente a peca de la guayaba.
<b>Cass</b>	Portainjerto	Amarilla	Blanca	Yautepec, Morelos	Peso de fruto menor de 150g, planta tolerante al ataque de nematodos
<b>Arrayán</b>	Portainjerto, fresco	Amarilla	Blanca	Yautepec, Morelos	Peso de fruto menor de 20g de 1.5 a 3 cm de diámetro, planta tolerante al ataque de nematodos
<b>Catleianum</b>	Ornato, Industria	Rojo y amarillo	Roja y amarilla	Yautepec, Morelos	Frutos entre 2.5 a 3.5 cm de diámetro

**Cuadro A.1** Características de 16 selecciones de guayaba y cuatro especies de *Psidium*.

<b>Genotipo</b>	<b>Propósito (consumo)</b>	<b>Maduración</b>	<b>Color pulpa</b>	<b>Lugar de colecta</b>	<b>Características</b>
<b>Guayabilla</b>	Portainjerto, Fresco	Amarilla			Frutos pequeños de 1.5 a 2.5 cm de diámetro, patrón enanizante.