



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GENETICA

**PROPAGACIÓN *in vitro* DE PORTAINJERTOS PARA GUAYABO:
CASS (*Psidium friedrichsthalianum*) Y ARRAYÁN (*Psidium
sartorianum*)**

BLANCA BERENICE FLORES ESPINOSA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2011

La presente tesis, titulada: **Propagación *in vitro* de portainjertos para guayabo: Cass (*Psidium friedrichsthalianum*) y Arrayán (*Psidium sartorianum*)**, realizada por la alumna: Blanca Berenice Flores Espinosa, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
GENÉTICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA: _____



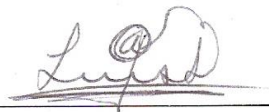
DRA. MA. DEL CARMEN MENDOZA CASTILLO

ASESOR: _____



DR. RICARDO LOBATO ORTÍZ

ASESOR: _____



DR. JOSE LUIS DOMÍNGUEZ ÁLVAREZ

Montecillo, Texcoco, México, septiembre 2011

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE PORTAINJERTOS PARA GUAYABO: CASS
(*Psidium friedrichsthalianum*) Y ARRAYÁN (*Psidium sartorianum*)

Blanca Berenice Flores Espinosa, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2011

Se desarrolló una metodología para la propagación *in vitro* de portainjertos para guayabo. Cass (*Psidium friedrichsthalianum*) y Arrayán (*Psidium sartorianum*) en las etapas de establecimiento; y multiplicación y enraizamiento en Cass. Para la obtención de explantes para establecimiento de Cass y Arrayán se utilizaron brotes jóvenes provenientes de plantas madre que crecieron bajo dos condiciones: sombreadas (70 %) y sin sombra. Para evaluar el tiempo de desinfección se utilizó hipoclorito de calcio 1 % durante 10, 15, 20 y 25 min. El mejor resultado para Cass se obtuvo al usar explantes que crecieron bajo sombra y un tiempo de desinfección de 25 min, con un porcentaje de sobrevivencia (75 %). En Arrayán el mayor porcentaje (56 %) se logró al usar explantes que crecieron bajo sombra, con tiempo de desinfección de 15 min. Se observó que los explantes de plantas madre sombreadas tuvieron mayor porcentaje de sobrevivencia. En la multiplicación se evaluaron los reguladores BAP y GA₃ en dos variantes de medio de cultivo: a) sales MS más BAP 0.5 ml.L⁻¹; y b) igual que a) más GA₃ 30 µL; utilizando dos tipos de explantes: ápices y nudos. Los mejores resultados se observaron al utilizar ápices, la mayor longitud y el mayor número de nudos se obtuvo en el tratamiento MS+ BAP+ AG₃; sin embargo, el mayor número de brotes y mejor coeficiente de multiplicación se obtuvo en el tratamiento MS+BAP. En el enraizamiento Cass se evaluaron los reguladores AIA y ANA utilizando cuatro variantes del medio de cultivo: a) sales MS b) mismo medio de a) más 2 g.L⁻¹ de carbón activado; c) sales MS más AIA 1 ml.L⁻¹ y ANA 1 ml.L⁻¹; y d) igual que c) más carbón activado 2 g.L⁻¹. La mayor cantidad de raíces se logró al utilizar MS+ANA+AIA; sin embargo; la mayor longitud, más número de nudos y mayor número de brotes se obtuvieron al utilizar el medio de cultivo MS solo, aunque el enraizamiento fue menor.

Palabras clave: *Psidium friedrichsthalianum*, *Psidium sartorianum*, cultivo de tejidos, organogénesis directa.

IN VITRO PROPAGATION OF ROOTSTOCKS FOR GUAVA: CASS (*Psidium friedrichsthalianum*) AND ARRAYÁN (*Psidium sartorianum*)

Blanca Berenice Flores Espinosa, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2011

A methodology for *in vitro* propagation of rootstocks for guava was developed for both Cass (*Psidium friedrichsthalianum*) and Arrayán (*Psidium sartorianum*) in the early stages of establishment; and multiplication and rooting only for Cass. To obtain explants for the establishment of Cass and Arrayán, young shoots from mother plants growing under two conditions: shade (70 %) and no shade were used. In order to evaluate the disinfection time, 1 % calcium hypochlorite for 10, 15, 20 and 25 min was used. The best result was obtained using Cass explants grown under shade and a disinfection time of 25 min, with a survival rate of 75 %. In the case of Arrayán, the highest percentage (56 %) was achieved using explants grown under shade, with disinfection time of 15 min. It was observed that explants from mother plants growing in the shade had a higher percentage of survival. For the phase of multiplication, the growth regulators BAP and GA₃ were evaluated in two different culture media: a) MS salts more BAP 0.5 ml.L⁻¹, and b) as a) plus 30 µL GA₃, using two types of explants: shoots and knots. The best results were observed when using apex, the longest and the largest number of nodes was obtained in the treatment combining MS+BAP+GA₃, but the largest number of outbreaks and better multiplication coefficient was obtained in the treatment MS + BAP. In the rooting of Cass, the regulators AIA and ANA were assessed using four culture medium variants: a) MS salts b) the same means of a) plus 2 gL⁻¹ of activated carbon, c) MS salts plus AIA 1ml.L⁻¹ and ANA 1 ml.L⁻¹, and d) same as c) plus activated carbon 2 gL⁻¹. The largest number of roots was obtained using a combination of MS + ANA + IBA; however, greater length, more number of knots and greater number of shoots were obtained by using the culture medium MS alone, although rooting was lower.

Key words: *Psidium friedrichsthalianum*, *Psidium sartorianum*, tissue culture, direct organogenesis.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por todo lo que me ha dado y por permitirme lograr un objetivo más en la vida.

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

A Fundación Produce Zacatecas, por el financiamiento parcial de esta investigación.

A los integrantes de mi Consejo Particular: A la Dra. Ma. del Carmen Mendoza Castillo, al Dr. José Luis Domínguez Álvarez y al Dr. Ricardo Lobato Ortíz: por su tiempo, apoyo, paciencia, colaboración, y por sus valiosas aportaciones académicas para la culminación de este trabajo.

Agradezco a todos los académicos y docentes del Colegio de Postgraduados que contribuyeron en mi formación, por las facilidades brindadas, por su apoyo y comprensión.

Al Dr. Oscar Concepción Laffite, a la Msc. Lelurlys Nápoles Borrero y a la Msc. Mariela Cid Ruiz, del Centro de Bioplasmas de Ciego de Avila, Cuba, por sus consejos, asesorías y contribuciones para la mejora de este trabajo.

Sinceramente

BLANCA BERENICE

DEDICATORIA

A mis papas, Luis y Mercedes, por su apoyo incondicional, por todo lo que me han enseñado, por su comprensión y su paciencia, por ser mi inspiración, este logro también es suyo. Gracias, los amo.

A mis hermanos, Cesar e Ivonne, porque pase lo pase se que siempre puedo contar con ustedes, por todo lo que hemos vivido juntos, los quiero mucho.

A mis sobrinitos, Pao y Dieguito, por formar parte de mi vida, los quiero.

A Toño, por estar siempre a mi lado, esto no hubiera sido lo mismo sin ti, gracias por todo el apoyo y ayuda que me has dado, simplemente por formar parte de mi vida. Te amo bu!

A toda mi familia, abuelos, tíos, primos, a Gyna, porque siempre están muy presentes y se preocupan por mí, por su apoyo, Gracias.

A Rebeca y Vany, porque todos los lindos momentos que hemos compartido, por la amistad que nos une, se les quiere y estima mucho.

A mis grandes amigos, Itzel y Martin, porque aunque la distancia es muy grande, siempre podrán contar conmigo, con mucho cariño.

A todos mis amigos y compañeros del Colpos, pero especialmente a Gaby y Javier por todos los momentos compartidos, y todo su apoyo, con cariño, muchas gracias!

Sinceramente
BLANCA BERENICE

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo General	3
1.1.1 Objetivos particulares	3
1.2 Hipótesis	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Origen del género <i>Psidium</i>	5
2.2 Clasificación Taxonómica	5
2.3 Importancia del cultivo de guayabo.....	6
2.4 Descripción morfológica	7
2.4.1 Guayaba (<i>Psidium guajava</i> L.).....	7
2.4.2 Cass (<i>Psidium friedrichsthalianum</i>).....	8
2.4.3 Arrayán (<i>Psidium sartorianum</i>)	9
2.5 Métodos de propagación del guayabo	9
2.5.1 Propagación sexual	9
2.5.2 Propagación asexual	10
2.5.3 Cultivo de tejidos.....	12
2.6 Regeneración de especies propagadas <i>in vitro</i>	13
2.7 Procesos morfogenéticos <i>in vitro</i>	14
2.8 Aplicación de la organogénesis <i>in vitro</i> en la propagación del guayabo	16
2.9 Propagación <i>in vitro</i> de guayabo.....	16
2.9.1 Establecimiento <i>in vitro</i> de guayabo	17
2.9.2 Multiplicación <i>in vitro</i> de guayabo	19
2.9.3 Enraizamiento <i>in vitro</i> de guayabo.....	20
2.10 Oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados <i>in vitro</i>	20

2.11 Reguladores de crecimiento.....	24
2.11.1 Auxinas	24
2.11.2 Citocininas	24
2.11.3 Giberelinas.....	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1 Material Genético	26
3.2 Localización del experimento	26
3.3 Manejo del laboratorio, material y procedimientos generales	27
3.3.1 Acondicionamiento del laboratorio	27
3.3.2 Lavado de material de laboratorio.....	27
3.3.3 Cuarto de incubación	28
3.4 Descripción de los tratamientos	28
3.4.1 Establecimiento <i>in vitro</i> de Cass (<i>P. friedrichsthalianum</i>) y Arrayán (<i>P. sartorianum</i>).....	28
3.4.1.1 Tiempo de desinfección en brotes de plantas sombreadas y soleadas	28
3.4.1.1.1 Manejo de plantas madre	28
3.4.1.1.2 Colecta de explantes	29
3.4.1.1.3 Tiempos de desinfección de explantes	29
3.4.1.1.4 Siembra de explantes.....	29
3.4.1.1.5 Descripción de los tratamientos	30
3.4.1.1.6 Diseño experimental.....	30
3.4.1.1.7 Variables evaluadas	32
3.4.2 Multiplicación <i>in vitro</i> de Cass (<i>P. friedrichsthalianum</i>)	32
3.4.2.1 Efecto de bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (GA ₃) sobre la brotación, en la etapa de multiplicación.....	32
3.4.2.2 Descripción de los tratamientos.....	33
3.4.2.3 Diseño experimental	34
3.4.2.4 Variables evaluadas	34
3.4.3 Enraizamiento <i>in vitro</i> de Cass (<i>P. friedrichsthalianum</i>).....	35

3.4.3.1 Efecto del ácido indolacético (AIA), del ácido naftalenacético (ANA) y de carbón activado sobre el enraizamiento <i>in vitro</i>	35
3.4.3.2 Descripción de los tratamientos.....	35
3.4.3.3 Diseño experimental	36
3.4.3.4 Variables evaluadas	36
3.5 Análisis estadístico.....	37
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1 Establecimiento <i>in vitro</i> de Cass (<i>P. friedrichsthalianum</i>) y Arrayán (<i>P. sartorianum</i>).....	38
4.1.1 Tiempo de desinfección en brotes de plantas sombreadas y soleadas	38
4.2 Multiplicación <i>in vitro</i> de Cass (<i>P. friedrichsthalianum</i>)	43
4.2.1 Efecto de bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (GA3) sobre la brotación, en la etapa de multiplicación	43
4.3 Enraizamiento <i>in vitro</i> de Cass (<i>P. friedrichsthalianum</i>).....	47
4.3.1 Efecto de los reguladores de crecimiento ácido indolacético (AIA) y Ácido Naftalenacético (ANA), y uso de carbón activado, sobre el enraizamiento <i>in vitro</i>	47
V. CONCLUSIONES	50
VI. BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Estrategias utilizadas en la propagación <i>in vitro</i> , para evitar o disminuir los problemas de oxidación.....	23
Cuadro 2. Tratamientos de tiempos de desinfección evaluados considerando dos especies, dos condiciones de crecimiento y cuatro tiempos de desinfección.....	31
Cuadro 3. Tratamientos para multiplicación de Cass <i>in vitro</i> considerando las variantes en el medio de cultivo y los tipos de explante.	34
Cuadro 4. Tratamientos de enraizamiento de Cass <i>in vitro</i> , considerando las diferentes variantes del medio de cultivo.....	36
Cuadro 5. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables contaminación y oxidación por fenoles al exponer los explantes a diferentes tiempos de desinfección durante el establecimiento <i>in vitro</i> de Cass y Arrayán.	38
Cuadro 6. Comparación de medias para los explantes de sol y sombra con diferentes tiempos de desinfección en el establecimiento <i>in vitro</i> de Cass y Arrayán.	42
Cuadro 7. Cuadrados medios y niveles de significancia para diferentes variables al incorporar al medio de multiplicación dos reguladores de crecimiento y utilizando dos tipos de explantes.....	44
Cuadro 8. Comparación de medias de cada una de las variables utilizando dos medios de cultivo y dos tipos de explantes durante la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de Cass.	46

Cuadro 9. Cuadrados medios y niveles de significancia para las diferentes variables utilizando variantes en el medio de cultivo para el enraizamiento <i>in vitro</i> de Cass.	47
Cuadro 10. Comparación de medias para diferentes variantes de medio de cultivo en el enraizamiento <i>in vitro</i> de Cass.	49

I. INTRODUCCIÓN

El guayabo (*Psidium guajava* L.) se considera uno de los cultivos tropicales más importantes por su agradable sabor y su valor alimenticio (Medina y Pagano, 2003), por el uso medicinal de sus compuestos (Jaiarj *et al.*, 1999; Lozoya *et al.*, 2002) y la creciente demanda en mercados nacionales e internacionales (Pages, 2004; FAO, 2005).

En México existe una gran variabilidad de especies del género *Psidium*, siendo *P. guajava* el más grande, le siguen *P. sartorianum*, *P. guineense* Swartz, *P. friedrichsthalianum* (Berg.) Nied, *P. salutare*, *P. galapageium*, *P. cattleianum* y *P. cattleianum Lucidum*, los cuales poseen una excelente adaptación tanto al clima como al suelo y pueden comportarse como árbol caducifolio o perennifolio, según la disponibilidad de humedad.

Esta capacidad de respuesta del guayabo a las diferentes condiciones ambientales puede estar asociada a la enorme variabilidad genética existente en México, por ser uno de los centros de origen de la especie (Hayes, 1960; Popenoe, 1974). La variabilidad genética de una especie favorece el potencial para sobrevivir ante los cambios en el proceso evolutivo (Vida, 1994) y es el punto de partida para detectar genotipos sobresalientes, utilizando marcadores morfológicos, fisiológicos y moleculares que correlacionen con caracteres de interés agronómico y así dar pasos firmes en un programa de fitomejoramiento para generar variedades de interés comercial.

Aún con lo anterior, existen numerosos problemas que afectan el cultivo del guayabo, desde diferentes perspectivas. Sobresale una alta incidencia de plagas y enfermedades (Peña *et al.*, 1996). Otro problema importante es la propagación de plantas, ya que en esta especie se lleva a cabo mediante el uso de estacas; sin embargo, es un proceso de baja eficiencia, debido a la alta oxidación por fenoles producidos en la base de la estaca, que impide el buen enraizamiento, además de la existencia limitada de plantas progenitoras en algunos cultivares. El acodo y el injerto

se ven severamente afectados por la contaminación ambiental, por lo que son empleados con muy poco éxito para producir grandes cantidades de plantas (Pérez *et al.*, 2002). La propagación sexual constituye otro método de propagación convencional; sin embargo, se reconoce que produce hasta 30 % de variación en los fenotipos obtenidos.

La propagación *in vitro* constituye una opción viable para la propagación masiva de progenies sanas y uniformes genéticamente (Concepción *et al.*, 2005).

La guayaba como muchas otras plantas puede propagarse con el empleo de técnicas de cultivo *in vitro*, las cuales han mostrado resultados altamente ventajosos en la propagación rápida de diversas especies económicamente importantes (Pérez *et al.*, 2002). El cultivo *in vitro* por segmentos nodales es una técnica que permite propagar asexualmente a estas especies, manteniendo las características agronómicas deseadas, esto se debe a que las yemas axilares del explante se desarrollan en brotes, ocurriendo una organogénesis directa. Sin embargo, se considera que existen dos problemas cruciales para lograr la micropropagación exitosa de este cultivo: el primero es la contaminación y el segundo la oxidación por fenoles u oscurecimiento de los tejidos, principalmente cuando se parte de material colectado directamente del campo (Ramírez *et al.*, 1999).

En la diversidad que presenta el género *Psidium* se encuentra el Cass (*P. friedrichsthalianum*) y el Arrayán (*Psidium sartorianum*), las cuales son especies que por su rusticidad y alto vigor pueden ser utilizadas como portainjertos. El Cass es difícil de propagarse por semilla, pero tiene la característica de ser tolerante al ataque de nemátodos. La presencia de nemátodos provoca un deterioro en los árboles y la reducción en la producción de frutos de guayaba (Perales, 2001).

El propósito fundamental de la presente investigación fue encontrar un método de propagación *in vitro* óptimo para Cass (*P. friedrichsthalianum*) y Arrayán (*Psidium sartorianum*), mediante la siembra de yemas apicales. La utilización de yemas apicales no genera variabilidad genética, esto es importante para conservar las características de ambas especies que podrán ser utilizadas como portainjertos para *Psidium guajava*.

1.1 Objetivo General

- Desarrollar una metodología para la propagación *in vitro* de los portainjertos para guayabo de las especies Cass (*Psidium friedrichsthalianum*) y Arrayán (*Psidium sartorianum*).

1.1.1 Objetivos particulares

- Desarrollar un método para el establecimiento *in vitro* de las especies Cass (*P. friedrichsthalianum*) y Arrayán (*P. sartorianum*).
- Determinar el tiempo óptimo de desinfección para el establecimiento *in vitro* de yemas vegetativas, en cada una de las especies.
- Evaluar el efecto del sombreado de las plantas madre sobre el rejuvenecimiento de las yemas vegetativas, en cada una de las especies.
- Evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento durante la multiplicación y el enraizamiento *in vitro* de Cass.

1.2 Hipótesis

- Es posible establecer en condiciones *in vitro* yemas vegetativas de las especies Arrayán y Cass.
- Las yemas vegetativas de plantas madre desarrolladas bajo condiciones de sombreado son más juveniles en comparación con las yemas de plantas madre expuestas directamente al sol, por lo que presentan menos problemas de oxidación por fenoles durante la fase de establecimiento *in vitro*.
- El uso de bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (GA₃) inducen mayor brotación y alargamiento de los explantes durante la fase de multiplicación *in vitro*.

- Durante el enraizamiento *in vitro*, el carbón activado en el medio de cultivo mejora la absorción de los reguladores de crecimiento favoreciendo la formación de un mejor sistema radical.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen del género *Psidium*

El guayabo (*Psidium guajava* L.) tiene su origen en el trópico americano (Bourke, 1975) y las más de 140 especies de *Psidium* presentes en América se distribuyen desde México y Centroamérica hasta Perú. Diversos autores coinciden en señalar a México como uno de los centros de origen por la gran variabilidad de tipos de guayaba (Mata y Rodríguez, 2000; Hayes, 1960; Popenoe, 1974). También existen antecedentes de que la guayaba fue domesticada en Perú desde hace varios miles de años, dado a que se han encontrado semillas de guayaba en sitios arqueológicos peruanos (Smith, 1988).

El Cass (*Psidium friedrichsthalianum*) es originario de Centroamérica (León, 1987). El vocablo Cass fue tomado de un nombre indígena de Costa Rica en donde también se le conoce como guayaba costarricense o guayaba agria en otros países como Colombia (León, 1987); en Nicaragua se conoce como guayaba de fresco (Barbeau, 1990).

El Arrayán (*Psidium sartorianum*) es originario de México y Centroamérica. En México se le conoce con diferentes nombres como Choquey (Chihuahua), guayaba tejón (Veracruz), guayabillo (Chiapas), pichiché (Yucatán), rayana (Oaxaca), arrayán (Sinaloa y Durango); y en países como Costa Rica se le nombra cacique. Se distribuye desde México, Centroamérica, las Antillas, Norte de Colombia y Venezuela (Sánchez, 1990).

2.2 Clasificación Taxonómica

El guayabo pertenece al Reino Plantae, Subreino Fanerogamae, Subdivisión Lignosae, Clase Angiospermae, Subclase Dicotiledoneae, Orden Myrtales, Género *Psidium*, Especie *guajava* (González *et al.*, 2002). La familia Myrtaceae,

representada en su mayoría por árboles y arbustos, cuenta con más de 3800 especies agrupadas en aproximadamente 133 géneros (Wilson *et al.*, 2001; Sytsma y Litt, 2002).

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

2.3 Importancia del cultivo de guayabo

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

Los principales países productores de guayaba son: Pakistán, Egipto, México, Bangladesh, Estados Unidos, Brasil, Colombia, Perú, Ecuador, India, Sudáfrica, Filipinas, Venezuela, Costa Rica, Cuba y Puerto Rico.

De acuerdo con SAGARPA (2009) en México se produce guayaba en 21 estados, con una superficie plantada de 22 373 ha. Con base en la superficie plantada, los estados con mayor importancia son Michoacán, Aguascalientes y Zacatecas, con 9 335, 6 643 y 3 955 ha, respectivamente, con una producción promedio de 13.9, 15.8 y 9.2 ton.ha⁻¹, respectivamente. En estas plantaciones predomina el tipo criollo conocido como 'Media China' (Padilla *et al.*, 2002).

En el contexto social, el cultivo de guayabo es importante en México debido al requerimiento elevado de mano de obra, ocupa un promedio de 180 jornales/ha/año. La mayoría de las huertas son de tamaño pequeño, oscilan en promedio de 3 a 5 ha, por lo cual, el número de productores es elevado, se reportan más de 7 000 productores a nivel nacional (Padilla, 2007).

2.4 Descripción morfológica

2.4.1 Guayaba (*Psidium guajava* L.)

El guayabo es un árbol de 3 a 10 m de altura, con tronco corto y ramas cerca de la superficie del suelo que varían de 10 a 30 cm de diámetro, frecuentemente produce gran cantidad de brotes en la base del tronco (El-Baradi, 1975).

El árbol crece simétricamente y presenta forma de domo. La corteza es lisa, tersa y de color café rojizo oscuro; y ésta se desprende en delgadas escamas (González *et al.*, 2002). Las ramas jóvenes frecuentemente son de color rojizo; sin embargo, también pueden ser de color verde amarillo y están cubiertas de fina vellosidad. Las ramas completamente desarrolladas o maduras se tornan de color café rojizo claro, opacas, lisas y con lenticelas.

La raíz destaca por su gran capacidad de anclaje, por ello se le ha comparado con *Litchi chinensis*. Tiene gran cantidad de raíces de 1 mm de diámetro o más, por lo que dispone de un gran poder de absorción (Mata y Rodríguez, 2000).

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

Las flores son hermafroditas, axilares, pediceladas, solitarias o en racimos cortos de dos a tres flores sobre brotes jóvenes, rara vez terminales, con un diámetro de 3.9 cm. El pedicelo es redondeado, de 2 a 4 cm de largo y de color verde amarillento. El tubo del cáliz es turbado y algunas veces ovoide, no crece más allá del ovario y es de 0.6 a 0.7 cm de largo. Los cuatro o cinco pétalos son abovados, blancos, cubiertos de pubescencia densamente apretada en ambas superficies o lisos por

dentro y de 1.5 a 2.0 cm de largo. Los estambres son numerosos, se encuentran insertados en hileras alrededor del disco y desarrollan una longitud de 1 a 1.5 cm; los filamentos son blancos y las anteras son ovoidea-oblongas o elipsoidales de color amarillo claro. El estilo es filiforme, liso, de color verde amarillento (González *et al.*, 2002; Ochse, 1976).

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

Las semillas son numerosas, reniformes, pequeñas, de color amarillo claro o café amarillento de 0.3 a 0.5 cm de largo y de 0.2 a 0.3 cm de ancho (Yadava, 1996).

2.4.2 Cass (*Psidium friedrichsthalianum*)

El árbol de Cass es de tamaño pequeño a mediano, algunos llegan a medir hasta 7 m de altura. La corteza es lisa y de color marrón oscuro. Las ramas jóvenes son cuadrangulares, de color rojizo, con pocos tricomas. Las hojas son ovaladas y oblongas, de 3.5 a 7.5 cm de largo, de color verde oscuro brillante en el haz y verde claro en el envés, cubiertas de pequeños y finos tricomas. El ápice de la hoja es

acuminado y la base es aguda. La nervadura central es prominente. Las flores son individuales de color blanco que crecen en las axilas de las hojas, miden alrededor de 2.5 cm de ancho. Cada flor tiene cinco pétalos de aspecto ceroso, un estigma y ovario inferior con cinco lóculos. Los frutos son pequeños, de color amarillo oscuro, globosos o ligeramente ovalados de 3.8 a 6.4 cm de ancho, algunos frutos tienen muy poca semilla, de 2 a 4. La epidermis de los frutos es delgada y la pulpa es suave, blanca, muy ácida, y tiene un alto contenido de pectina (Tong y Khay, 1990). Estudios realizados en Cuba indican que esta especie es resistente al nemátodo del nudo de la raíz (*Meloidogyne spp.*).

2.4.3 Arrayán (*Psidium sartorianum*)

El Arrayán es un árbol de 2 a 15 m de altura; la corteza externa es pardo-amarillenta con manchas grisáceas que se desprende en placas delgadas; la corteza interna es rosada y las ramas son de color gris y cilíndricas. En época de floración las hojas son membranáceas de color verde-amarillentas y pálidas, en la madurez son coriáceas, verdes o verde pálidas, con manchas pálidas en el haz, verde-amarillentas en el envés, aromáticas, de elípticas a ovalolanceoladas. Las flores son generalmente solitarias, algunas veces en dicasios con la flor central sésil, axilares. Los frutos de globosos a piriformes u oblandos, de 1 a 2.5 cm de diámetro, amarillos, con sabor dulce o agridulce, coronados en el ápice con los lóculos del cáliz; semillas de 5 a 8 mm de largo, con la testa dura (Sánchez, 1990).

2.5 Métodos de propagación del guayabo

2.5.1 Propagación sexual

En algunos países la propagación por semilla es el principal método para obtener plantas de guayaba, las cuales son utilizadas para establecer huertas comerciales. (Mata y Rodríguez, 2000). Sin embargo, los árboles obtenidos por este método, aun

cuando son muy vigorosos, tardan más tiempo para entrar en producción, debido a su largo periodo de juvenilidad (Hartman y Kester, 1971). Además de que las plantas en estas huertas presentan una alta variabilidad genética, los árboles presentan diferentes portes y tipos de frutos que varían en tamaño, forma y color, entre otras características (Galletta, 1988). La propagación sexual en México se hace únicamente para la multiplicación del portainjerto *Psidium friedrichsthalianum*, el cual, además de tener ciertas características de tolerancia a factores adversos como a nemátodos y marchitamiento (Mata y Rodríguez, 2000), es compatible para injertar sobre él diversas variedades de guayabo seleccionadas para la producción comercial.

2.5.2 Propagación asexual

La propagación asexual es la técnica adecuada para obtener plantaciones uniformes. En guayabo la propagación asexual consiste en la reproducción de individuos a partir de partes vegetativas de las plantas, como ramas y brotes o hijuelos, los cuales tienen capacidad de regeneración.

En guayabo se han utilizado como métodos convencionales de propagación asexual los hijuelos, el acodo, las estacas e injertos:

Hijuelos de raíz: La propagación de guayaba por medio de hijuelos de raíz se obtiene cortando las raíces que se localizan a 1 m de distancia del tronco; éstas producen hijuelos que después se pueden trasplantar en bolsas para establecer el vivero.

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

- *Estacas herbáceas*: La propagación de guayabo utilizando estacas herbáceas se realiza colectando las estacas del último crecimiento vegetativo; es decir, las ramas no deben estar lignificadas, son de color verde y angulares. Lo primero que se debe hacer es la selección de las plantas madre, las cuales deben tener características como resistencia a plagas y enfermedades, además de tener una alta productividad. Las plantas madre deben estar bien irrigadas y fertilizadas, libres de plagas y enfermedades. Una vez seleccionadas las plantas donadoras se colectan las estacas de aproximadamente 12 cm de longitud con al menos un par de hojas; para un mejor enraizamiento se pueden utilizar reguladores de crecimiento de tipo auxínico (AIB) para obtener hasta 80 % de enraizamiento en 20 días. Las estacas pueden ser colocadas en charolas con arena (Manica, 2000).
- *Estacas leñosas*: La propagación mediante estacas leñosas se inicia con la poda de las plantas madre para estimular la formación de nuevas ramas. Se deben seleccionar ramas de 1 año de edad, de 10 a 15 mm de diámetro con 20 cm de longitud, aproximadamente. Las hojas de cada estaca deben ser eliminadas para evitar que se deshidraten, también se deben colocar en bolsas de plástico bajo la sombra, para disminuir la pérdida de agua por transpiración. Después se pasan al sustrato que puede ser tierra o arena, y se sumergen en él de 8 a 10 cm de profundidad con una separación entre ellas de 8 a 10 cm y se recomienda cubrirlas para disminuir la pérdida de humedad. Los porcentajes de enraizamiento mejoran si las estacas se sumergen previamente en una solución con auxinas (ANA y AIB). El tiempo de enraizamiento puede variar de 2 a 3 meses (Manica, 2000).

Acodos: Se considera un método de propagación fácil, rápido y económico, evita la transmisión de enfermedades o nemátodos noduladores y mantiene las características de las plantas madre (González *et al.*, 1999). Presenta la desventaja de obtener plantas de poco vigor y un sistema radical pobre (Zeledon y Wan, 1994).

- *Acodos aéreos*: Es probablemente el método comercial más usado en México para la producción de plantas de guayabo. Para realizar el acodo aéreo es

necesario seleccionar el árbol de acuerdo a las características que se pretenden mantener en la nueva huerta, como época de producción (precoz o tardía), alta productividad, calidad del fruto (tamaño, consistencia o dulzor), así como resistencia a plagas y enfermedades. El acodo se puede realizar después de cosechar la fruta o durante el desarrollo de la misma, lo importante es que la corteza de las ramas se pueda desprender fácilmente y se proporcione humedad al árbol hasta que el acodo sea separado de la planta madre (González *et al.*, 2002).

Injerto: Es la técnica por la cual se unen dos partes de diferentes plantas, de manera que puedan seguir su crecimiento como una sola planta; así, se implanta una variedad adecuada a las exigencias del mercado (Perales, 2001) sobre otro individuo (portainjerto) que tenga las características de tolerancia a factores adversos, como es el caso de la especie *Psidium friedrichsthalianum* para el cultivo del guayabo.

2.5.3 Cultivo de tejidos

Es una técnica no convencional en la propagación de guayabo, en algunos países se está utilizando como alternativa para reemplazar plantaciones en un tiempo corto. El cultivo de tejidos consiste en colocar un trozo de tejido (explante), órgano o embrión en medios artificiales y en condiciones ambientales determinadas para regenerar un individuo completo (Cubero, 2002), lo cual es posible por la totipotencia que tienen las células vegetales; esto es, la capacidad de regenerar una planta completa cuando las células vegetales están sujetas a los estímulos adecuados. Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posean y al estímulo que reciban (Olmos *et al.*, 2004).

Esta técnica es aplicable solo para un número reducido de especies, el hacerlo con todas sería cuestión de tiempo, la dificultad se encuentra en que aún no se conoce el mecanismo biológico que permite la regeneración. Las especies que mejor se

regeneran *in vitro* son aquéllas que tienen reproducción vegetativa, a diferencia de las de estricta reproducción sexual.

El cultivo de tejidos tiene diversas aplicaciones y ventajas, se pueden producir numerosas plantas libres de enfermedades en espacios pequeños, además de que es una opción para la conservación de germoplasma (Cubero, 2002).

2.6 Regeneración de especies propagadas *in vitro*

La propagación *in vitro* es aplicada en células, tejidos, raíces, nudos, entrenudos, cotiledones, embriones inmaduros, fragmentos de embriones, microsporas, anteras, entre otros. Los medios de cultivo pueden ser sólidos o líquidos, los cuales contienen sales minerales, azúcares, vitaminas y hormonas, entre estas últimas, las auxinas y las citocininas juegan un papel esencial debido a que al manejar proporciones adecuadas favorecen el desarrollo del tallo (caulogénesis) o el de la raíz (rizogénesis) de las nuevas plantas.

El cultivo *in vitro* puede hacerse usando meristemos, embriones o células (explantes). El explante es el órgano o tejido de la parte de la planta que se pretende propagar, por ejemplo el ápice, la hoja o un segmento de ella, un segmento de tallo, meristemo, embrión, nudo, semilla, antera, etc. (George, 2008).

Cultivo de meristemos: en los ápices se encuentra un grupo de células que conforman el meristemo apical (tiene un tamaño entre 0.01 y 0.3 mm), tejido que tiene la capacidad de formar todos los tejidos de la planta. A partir de ellos se pueden regenerar plantas completas, se utiliza principalmente para obtener plantas libres de virus y consiste en coleccionar pequeños ápices de tallo con uno o dos primordios foliares (George, 2008). El meristemo siempre es totipotente, por lo que la regeneración a partir de él no debe presentar problemas. El cultivo de embriones consiste en aislar embriones de semillas para después germinarlos *in vitro*. El cultivo

de embriones ayuda a la rápida producción de plántulas a partir de semillas que tienen un periodo de latencia prolongado (George, 2008).

El cultivo de células consiste en obtener callos a partir de algún explante, los mismos pueden disociarse para lograr una suspensión de células. Esta suspensión puede utilizarse para generar embriones somáticos (la base de las semillas sintéticas), o puede directamente cultivarse para producir metabolitos secundarios, que son compuestos químicos sintetizados por las células vegetales en determinadas condiciones, que son de gran utilidad para las industrias farmacéutica y alimenticia, entre otras (George, 2008). Por otro lado, con el cultivo de células se obtienen células bien diferenciadas que dan origen a estructuras organizadas (organogénesis) y a embriones somáticos (embriogénesis somática) (Cubero, 2002).

En el cultivo de explantes, éstos se colocan en un medio adecuado de establecimiento, para desarrollar una masa de tejido no diferenciada conocida como callo; el callo puede ser fraccionado en trozos para ser sembrados en nuevos tubos o cajas, para su conservación; a esta fase del proceso se le conoce como subcultivo, para así mantener las características del cultivo inicial y conseguir la organización celular necesaria y, con ello, la regeneración, que debe hacerse en un medio distinto al inicial. Al cambiar el callo de medio de cultivo se pueden formar, dependiendo de las características del medio de cultivo usado, tallos, raíces (organogénesis) o embriones somáticos (embriogénesis). La formación de callo permite una alta capacidad de multiplicación en las especies en las que la morfogénesis es fácilmente inducible (Cubero, 2002).

2.7 Procesos morfogenéticos *in vitro*

Los procesos morfogenéticos desarrollados en condiciones *in vitro* se clasifican en dos tipos: la organogénesis y la embriogénesis somática.

La organogénesis es la formación de una estructura unipolar, la cual se diferencia en un nuevo órgano que puede ser un meristemo caulinar (caulogénesis) o un meristemo radical (rizogénesis) (Pascual y Marín, 2005). 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, según sea el caso (Liu y Bao, 2003).

La embriogénesis se puede llevar a cabo por dos vías, la somática y la cigótica. La embriogénesis somática es el proceso mediante el cual una célula somática vegetal adquiere la capacidad para diferenciarse y formar una estructura embrionaria, sin que ocurra fusión de gametos. Aunque los procesos de la embriogénesis somática y la embriogénesis cigótica son activados por diferentes estímulos, se sabe que en ambos procesos existe la expresión de los mismos genes, por lo que se considera que ambos procesos convergen en la misma ruta de señalización, muy probablemente durante los eventos tempranos. Se ha reportado que la expresión del gen SERK (Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase) puede conferir capacidad embriogénica a células somáticas y es considerado como uno de los marcadores moleculares del inicio de la embriogénesis somática (Souza *et al.*, 2003).

Tanto la organogénesis como la embriogénesis pueden ocurrir de manera directa a partir del tejido del explante inicial, o de manera indirecta, a partir de tejido de menor organización, formado previamente y denominado callo (Merkle *et al.*, 1995). El manejo de estos procesos morfogénéticos en condiciones de cultivo *in vitro* ha permitido varias aplicaciones biotecnológicas, como la transformación genética (Tian *et al.*, 2002) y la conservación *in vitro* (Keller *et al.*, 2006).

La aplicación de los procesos morfogénéticos en la actualidad constituye una herramienta altamente rentable, ya que se pueden multiplicar numerosas especies y tipos de plantas. En frutales tropicales y subtropicales se han convertido en una alternativa, aun cuando existen métodos convencionales eficientes de propagación vegetativa (Litz y Jaiswal, 1991).

2.8 Aplicación de la organogénesis *in vitro* en la propagación del guayabo

El establecimiento y la definición de protocolos *in vitro* con tejidos (yemas adventicias, hipocótilos, cotiledones y hojas) de alta respuesta de regeneración en especies leñosas se considera importante para procesos de micropropagación masiva y para facilitar la tecnología de transformación genética. En diversas especies frutales y forestales se han hecho estudios para obtener plantas *in vitro* por medio de organogénesis directa (Pérez *et al.*, 2000).

Investigaciones realizadas por Loh y Rao (1989), Amin y Jaiswal (1988) y Pérez *et al.*, (2000) indican que es posible la propagación *in vitro* de guayaba mediante brotes adventicios. Sin embargo, Ramírez y Salazar (1998) encontraron dificultades al llevar a cabo la formación de callos y/o regeneración de brotes a partir de segmentos de hoja crecidas en campo, debido a la alta concentración de fenoles y en consecuencia, la baja viabilidad de los explantes.

Loh y Rao (1989) mencionan por primera vez la organogénesis directa a partir de hojas de brotes de guayabo que se multiplicaban *in vitro* como parte de experimentos de micropropagación. Trabajos realizados por Concepción *et al.* (2004) mencionan que es posible definir un procedimiento para la regeneración de brotes por organogénesis a partir de hojas de microesquejes o brotes de guayabo. Además, Ocampo y Núñez (2007) encontraron que al utilizar segmentos nodales permite en poco tiempo obtener brotes adventicios adecuados para la multiplicación masiva.

2.9 Propagación *in vitro* de guayabo

En guayabo, como en muchas otras especies de la familia Myrtaceae, se ha llevado a cabo la propagación con el empleo de técnicas del cultivo *in vitro* y se ha demostrado que posee resultados ventajosos con respecto a los métodos convencionales, ya que se puede propagar masivamente a la especie, y los

individuos propagados de esta manera son genéticamente iguales y libres de enfermedades.

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

2.9.1 Establecimiento *in vitro* de guayabo

El establecimiento *in vitro* de cualquier especie constituye el paso más importante del proceso tecnológico de micropropagación (George, 1993), en particular, el guayabo se ha caracterizado por lograr muy bajo porcentaje de explantes asépticos, debido al alto porcentaje de oscurecimiento que se presenta en los explantes por la alta deposición de fenoles y la baja capacidad de brotación. Es por esto que se considera la etapa de micropropagación más importante, ya que en ella se define el material vegetal inicial.

La presencia de microorganismos contaminantes como hongos y bacterias es también uno de los grandes problemas y ocurre principalmente cuando las plantas madre crecen directamente en el campo. También este fenómeno se favorece por las características morfológicas propias del cultivo, tales como la presencia de vellosidad en las hojas y tallos, que impiden la penetración de los desinfectantes, lo cual dificulta en extremo la eliminación de los microorganismos (Barker *et al.*, 1979) o puede deberse a técnicas inadecuadas de trabajo en el laboratorio (Alvarado, 1998).

Se han desarrollado estudios donde se comparan diversos agentes de desinfección. Ramírez y Salazar (1997) lograron asepsia en explantes de guayabo utilizando hipoclorito de calcio al 10 %, durante 15 min. En otros estudios se utilizaron

procedimientos complejos de doble desinfección con bicloruro de mercurio en concentraciones de 0.05 a 0.20 % (m/v) durante 2 a 15 min, combinado con inmersiones en etanol 70 % (v/v) por algunos segundos (Jaiswal y Amin, 1987); o también, un lavado de explantes con etanol 80 % (v/v) durante 5 min, seguido de una desinfección con hipoclorito de sodio 10 % (v/v) durante 10 min y varios enjuagues con agua destilada estéril con polivinil (PVPP) 0.5 % (m/v) (Papadatou *et al.*, 1990).

Frecuentemente el establecimiento de tejidos procedentes de plantas leñosas en el cultivo *in vitro* se ve impedido por la deposición de compuestos que provocan oscurecimiento en los tejidos. En el momento de hacer cortes se sintetizan compuestos fenólicos en los tejidos de las plantas, los cuales, posteriormente se oxidan y taponan los conductos vasculares, oscureciendo el medio y afectando el crecimiento y supervivencia de los explantes (Marks y Simpson, 1990). En el proceso de oxidación influye la edad de la planta y la ubicación del explante en la planta.

Se han utilizado varios métodos para disminuir el oscurecimiento y la muerte de los tejidos. Entre ellos se menciona el pretratamiento de los explantes con antioxidantes (Murashige, 1974), la incorporación de antioxidantes como el carbón activado al medio nutritivo (Claudebon *et al.*, 1988), el subcultivo frecuente en medio fresco, la inmersión en agua destilada estéril por algunas horas antes de la siembra *in vitro* (Vieitez, 1980) y la modificación de las condiciones ambientales *in vitro* al iniciar los cultivos en oscuridad o en bajas temperaturas (Hildebrandt y Harney, 1988) que han disminuido la muerte de los explantes. Sin embargo, el uso de todas estas técnicas generalmente afectan las condiciones óptimas para el crecimiento de los explantes (Marks y Simpson, 1990), debido a que todas ellas se aplican *in vitro*.

También, se ha demostrado que el mecanismo de oxidación fenólica e inhibición del crecimiento *in vitro* en plantas leñosas puede ser afectado por el nivel alto de radiación a la que están expuestas las plantas madre cultivadas en el campo, que evita la necesidad de incorporar procedimientos potencialmente inhibidores del crecimiento *in vitro*. Esto se basa en el metabolismo de los fenoles, donde existen procesos inducidos por la luz, tales como la actividad de sistemas enzimáticos

involucrados en la síntesis y oxidación de estos compuestos (Marks y Simpson, 1990).

Para limitar los procesos de oxidación de los tejidos, el medio de cultivo juega un papel importante como promotor de la brotación de las yemas. En la mayoría de los trabajos de investigación consultados, los medios de cultivo son muy similares. El medio más frecuente es el de Murashigue y Skoog conocido como MS, enriquecido con citocininas como bencilaminopurina (BAP) en concentraciones de 0.044-8.88 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ como principal regulador del crecimiento. La adición de reguladores del crecimiento de tipo auxínico como el ácido indolacético (AIA) en concentraciones de 0.57-2.85 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ asegura una mayor calidad de brotes (Jaiswal y Amin, 1987).

2.9.2 Multiplicación *in vitro* de guayabo

La multiplicación es la etapa de la propagación *in vitro* inmediata a la del establecimiento en la que se incrementa el número de material vegetal. La multiplicación *in vitro* de guayabo se realiza fundamentalmente por medio de segmentos nodales y brotación axilar.

Pérez *et al.* (2002) encontraron que para la multiplicación de ápices y segmentos nodales de la variedad de guayaba Enana Roja Cubana EEA 18-40, los mejores resultados se alcanzaron cuando se utilizaron ápices y se colocaron en un medio MS enriquecido de 0.5 mg.L^{-1} de BAP durante 30 días, logrando un coeficiente de multiplicación de 4.03.

En la multiplicación de los brotes del guayabo 'Cotorrera', los mejores resultados se lograron utilizando un medio de cultivo líquido con 4.4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de BAP y 2.85 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, con un coeficiente de multiplicación de 5.5 brotes por explante (Rodríguez *et al.*, 2006).

Rai *et al.* (2009) lograron una mejor multiplicación de brotes de guayabo utilizando 1 mg.L^{-1} de BAP en un medio MS.

2.9.3 Enraizamiento *in vitro* de guayabo

En la fase de enraizamiento se busca la formación de raíces con el fin de convertir los brotes en plántulas completas. En guayabo la mayoría de los trabajos mencionan al uso de reguladores de crecimiento de carácter auxínico.

Jaiswal y Amin (1987) encontraron una eficiencia entre 70 y 90 % para el enraizamiento de guayabo utilizando sales MS suplementadas con $0.98 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AIB y $1.07 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de ANA. Papadatou *et al.* (1990) tuvieron entre 85 y 95 % de enraizamiento al utilizar un medio basal suplementado con $2.46 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AIB y $2.69 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de ANA. Rodríguez *et al.* (2006) lograron 80 % de enraizamiento al añadir al medio $1.14 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AIA, $0.98 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AIB y 1.0 g.L^{-1} de carbón activado.

2.10 Oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*

El oscurecimiento de los tejidos cultivados *in vitro* se debe a una oxidación por radicales libres de diferentes componentes celulares, así como la oxidación de compuestos fenólicos catalizados por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son moléculas químicas propensas muy reactivas que generan daño en los tejidos e incluso, la muerte celular (Bray *et al.*, 2000).

En la propagación *in vitro*, la oxidación puede ser causada principalmente por el desinfectante usado en la asepsia, así como por el daño mecánico que ocasionan los cortes del explante, la composición del medio de cultivo y el volumen y calidad del frasco de cultivo, entre otros (Abdelwahd *et al.*, 2008).

El oscurecimiento de los explantes en el medio de cultivo es la limitante más importante en la propagación *in vitro* de las especies leñosas. Este problema está relacionado con el estrés oxidativo y nitrosativo que sufren las células del explante cultivado (George, 1996).

Muchos explantes después de su implantación *in vitro* empiezan a perder el color verde y muestran oscurecimiento, liberando frecuentemente exudados oscuros al medio de cultivo, cuya naturaleza no es precisa. Sin embargo, se sabe que son una mezcla compleja de sustancias fenólicas, producto del metabolismo secundario (Abdelwahd *et al.*, 2008). No todos los exudados liberados al medio de cultivo son inhibidores o tóxicos, pero en la mayoría de los casos cesa el crecimiento del explante, perdiendo gradualmente su capacidad de proliferar y, si no se remedia la situación, éste puede morir (Ogita, 2005).

De las estrategias que ayudan a evitar o disminuir los procesos de oxidación que conllevan al oscurecimiento de los tejidos del explante cultivado *in vitro*, Azofeita (2009) presenta algunas que se encuentran en el Cuadro 1.

Chacón y Gómez (1996) encontraron que el polivinil pirrolidona disminuyó los procesos oxidativos en los tejidos. No siempre es suficiente un solo método para disminuir el oscurecimiento causado por la oxidación. Thomas y Ravindra (1997) cultivando *in vitro* ápices de *Mangifera indica*, encontraron que la oxidación de tejidos y la exudación de fenoles, estuvieron interrelacionados e influenciados por factores como el tipo y época de escisión del explante, tratamiento de desinfección, medio de cultivo y el genotipo. Por tal motivo, al utilizar la mitad de la concentración de sales en el medio Murashige y Skoog (MS) observaron menor exudación de fenoles y mayor sobrevivencia de explantes. Otros factores relacionados con el explante que influyen en la oxidación de fenoles son el grado de desarrollo e incidencia de luz sobre el explante, el número de pecíolos en contacto con el medio de cultivo, la época de escisión del explante, la contaminación y viabilidad del explante son muy importantes, mientras que la edad y el número de hojas en el ápice no son relevantes.

El principal problema de oscurecimiento de los explantes de guayabo se debe a la presencia de sustancias fenólicas, las cuales pueden ser atenuadas o removidas con diferentes estrategias (Cuadro 1) o a través de pretratamientos. Por ejemplo, enjuagues al explante con agua destilada estéril, seguida de un proceso de desinfección para eliminar totalmente al agente desinfectante, así como para

remover los fenoles oxidados y otros productos del daño celular formados durante la preparación y desinfección del explante. En algunos casos se utiliza la inmersión y agitación de los explantes en agua destilada estéril, sola o con algún aditivo, durante cierto tiempo antes de su cultivo definitivo (George, 1996).

Otra forma de controlar la oxidación por fenoles es hacer subcultivos frecuentes; es decir, transferir el explante a un medio de cultivo fresco cuando el explante muestre indicios de oscurecimiento. Con frecuencia es necesario transferir, a intervalos de uno a siete días, requiriéndose, entre cinco y seis subcultivos para que la producción u oxidación de fenoles cese (Azofeifa, 2009).

El uso de subcultivos frecuentes para evitar o reducir los problemas de oxidación se ha utilizado en diferentes especies, entre ellas el guayabo (Amin y Jaiswal, 1988).

Cuadro 1. Estrategias utilizadas en la propagación *in vitro*, para evitar o disminuir los problemas de oxidación.

Estrategia

- a) Uso de explantes en estado juvenil o de material en crecimiento activo.
 - b) Crecimiento del explante en baja luminosidad o en oscuridad.
 - c) Crecimiento del explante en temperatura baja.
 - d) Subcultivos frecuentes.
 - e) Cultivo en medio líquido.
 - f) Uso de absorbentes en la preparación del explante para su cultivo o en el medio de cultivo.
 - g) Uso de antioxidantes en la preparación del explante para su cultivo o en el medio de cultivo.
 - h) Elección del medio de cultivo.
 - i) Elección de los reguladores de crecimiento.
 - j) Cambio del potencial osmótico del medio de cultivo.
 - k) pH bajo del medio de cultivo.
 - l) Inactivación de enzimas.
-

Fuente: Azofeifa, 2009.

2.11 Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento son fitohormonas importantes que actúan durante la propagación *in vitro*.

2.11.1 Auxinas

Las auxinas se generan principalmente en los tejidos jóvenes de la planta: ápices, frutos tiernos y hojas en desarrollo.

Las auxinas estimulan el alargamiento de los tallos y participan en la formación de las curvaturas fototrópicas (hacia la fuente de la luz), gravitrópicas (de acuerdo al vector de gravedad en la raíz o en el tallo). Participan en la orientación de la hoja con su superficie adaxial hacia la luz y transversalmente al vector de gravedad (gravitropismo) y además, en el crecimiento oblicuo con relación al vector de gravedad de los brotes laterales, estolones y raíces laterales. Promueven la formación de las raíces laterales y adventicias. Participan en la inhibición correlativa de las yemas axilares y brotes por el ápice del brote principal y por sus hojas juveniles. En la reproducción de plantas por medio de esquejes o estacas, las auxinas favorecen la regeneración de las raíces; este fenómeno está relacionado con la propiedad que tienen las auxinas, su transporte basípeto en el tallo. También, los tejidos donde se encuentran altas concentraciones de auxinas se convierten en el punto de atracción de nutrientes (Jankiewicz, 2003).

2.11.2 Citocininas

Las citocininas son sustancias naturales o sintéticas, capaces de estimular la división celular en presencia de auxinas, también ayudan a retrasar el envejecimiento. Aunque la dominancia apical está determinada principalmente por las auxinas, las

citocininas controlan y estimulan la brotación de las yemas laterales (Jankiewicz, 2003).

2.11.3 Giberelinas

Las giberelinas (GAs) son compuestos naturales que actúan como reguladores endógenos del crecimiento y desarrollo en los vegetales superiores. Las GAs son fitohormonas u hormonas nativas en las plantas que afectan, regulan o modulan el crecimiento. Los efectos más evidentes se observan en la germinación de las semillas, la estimulación del crecimiento del tallo, la inducción de la partenocarpia o la liberación de enzimas hidrolíticas (Jankiewicz, 2003).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material Genético

Se utilizaron dos especies del género *Psidium*: Arrayán (*P. sartorianum*) y Cass (*P. friedrichsthalianum*), de los cuales se obtuvieron los explantes.

Tanto las plantas de Arrayán como las de Cass fueron compradas en un vivero del estado de Morelos, los árboles tenían aproximadamente 2 años de edad y provenían de semilla.

Por cada especie se tuvieron seis plantas madre, de las cuales tres estuvieron en condiciones de sombreo al 70 % y las otras tres sin sombra, ambos grupos creciendo dentro de un invernadero. Las plantas madre se defoliaron cada vez que se colectaron explantes, con la finalidad de obtener yemas apicales lo más juveniles posible.

Todas las plantas se mantuvieron en condiciones óptimas de fertilización, la cual se hizo cada 15 días. En lo que respecta a los riegos, éstos fueron de manera manual y se aplicaron diariamente. Como modo preventivo, se hicieron aplicaciones de fungicidas y bactericidas; estas aplicaciones se realizaron tres a cuatro días antes de la colecta de los explantes, para reducir la presencia de agentes patógenos.

3.2 Localización del experimento

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Usos Múltiples del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, ubicada en el km 38.5 de la carretera México – Texcoco, en coordinación con el programa de Recursos Genéticos y Productividad- Genética, del Colegio de Postgraduados, ubicado en el km 36.5 de la Carretera México-Texcoco, Montecillo Edo. de México, y

el Laboratorio del Centro Estatal de Propagación Vegetal del Estado de Zacatecas, ubicado en el Municipio de Jerez. Los experimentos se llevaron a cabo en el periodo comprendido entre el mes de julio de 2009 al mes de diciembre de 2010.

3.3 Manejo del laboratorio, material y procedimientos generales

3.3.1 Acondicionamiento del laboratorio

Se realizó una desinfección previa con una solución de fenol 2 % en todas las áreas de trabajo; éstas fueron la cámara de incubación, el área de subcultivo y el área de preparación de medios de cultivo.

Las inoculaciones y trasferencias de explantes en los medios de cultivo se realizaron en una cabina de flujo laminar horizontal. La limpieza del material de laboratorio, pinzas, bisturís y cajas petri, utilizado dentro de la cabina se hizo mediante inmersión en etanol 70 % (v/v) y flameo con mechero de alcohol.

3.3.2 Lavado de material de laboratorio

Todo el material de laboratorio se lavó con detergente comercial, agua de la llave y se dio un enjuague final con agua destilada.

Las franelas para limpieza, así como las cajas petri, pinzas y bisturís se envolvieron en papel Craft y aluminio y se esterilizaron en una autoclave por 30 minutos, a una presión de $1 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ y a temperatura de $110 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.3 Cuarto de incubación

Los cultivos *in vitro* se desarrollaron en un cuarto de incubación, bajo un ambiente de 16 horas luz y 8 horas de obscuridad (luz artificial), y temperatura que osciló entre 25 ± 2 °C.

3.4 Descripción de los tratamientos

3.4.1 Establecimiento *in vitro* de Cass (*P. friedrichsthalianum*) y Arrayán (*P. sartorianum*)

3.4.1.1 Tiempo de desinfección en brotes de plantas sombreadas y soleadas

3.4.1.1.1 Manejo de plantas madre

Se evaluó el efecto del tiempo apropiado de desinfección con hipoclorito de calcio para disminuir la oxidación fenólica y los agentes patógenos en brotes provenientes de plantas sombreadas y soleadas, además de buscar una alternativa que sustituyera al desinfectante bicloruro de mercurio, por ser altamente tóxico, y definir cuáles brotes pudieran ser los mejores para la propagación *in vitro*, los provenientes de plantas con sombra o sin ella; se obtuvieron brotes jóvenes de las plantas madre. Se tuvieron tres plantas productoras de brotes por cada tratamiento de las dos especies y bajo dos condiciones de crecimiento, a unas se les colocó una malla sombra para reducir a 70 % la incidencia de radiación y a las otras plantas se les mantuvo sin sombra.

3.4.1.1.2 Colecta de explantes

Transcurridas dos semanas después de aplicar los tratamientos de sol y sombra, se colectaron los brotes más jóvenes (ápices de aproximadamente 2 cm de longitud con 2 nudos visibles), lo más temprano del día posible. Se tomaron los brotes desarrollados con estas características, de cada planta y de cada tratamiento, los cuales se colocaron en una solución antioxidante estéril de polivinilpirrolidona (PVPP) 5 % para su traslado al laboratorio, esta solución reduce la oxidación por fenoles. Los brotes colectados se lavaron con detergente comercial (detergente biodegradable Roma®) durante 5 min y se enjuagaron con agua de la llave.

3.4.1.1.3 Tiempos de desinfección de explantes

Después de lavados los brotes se les realizó una desinfección superficial con hipoclorito de calcio 1% durante los tiempos 10, 15, 20 y 25 min, con agitación constante. Posteriormente se hicieron cuatro enjuagues con la solución antioxidante estéril de PVPP 5 % hasta eliminar por completo el agente desinfectante. Esta desinfección se hizo en la cabina de flujo laminar.

3.4.1.1.4 Siembra de explantes

Cada explante de cada tratamiento se manejó en forma individual, eliminándole las láminas foliares y dejándole sólo los pecíolos, también se le hizo un corte en el área basal del tallo. Los explantes ya preparados y desinfectados se colocaron en tubos de ensayo que contenían 10 ml de medio sólido de establecimiento, constituido por las sales del medio basal MS suplementadas con sacarosa 30 g.L⁻¹, myo-inositol 10 ml.L⁻¹, tiamina 1 ml.L⁻¹, bencilaminopurina (BAP) 1 ml.L⁻¹, ácido indolacético (AIA) 1.5 ml.L⁻¹ y polivinilpirrolidona (PVPP) 0.25 g.L⁻¹.

3.4.1.1.5 Descripción de los tratamientos

Se hizo una sola siembra de explantes para cada una de las especies. Los tratamientos evaluados fueron los brotes provenientes de plantas madre crecidas bajo sombra y plantas madre crecidas sin sombra; a cada grupo se les aplicó los diferentes tiempos de desinfección (10, 15, 20 y 25 min), el número de explantes fue igual para cada una de las especies, se tuvieron 4 explantes de Cass y 4 explantes de Arrayán por cada tratamiento, número definido con base en la disponibilidad de brotes en las plantas madre. La combinación de estos factores dio como resultado 16 tratamientos, los cuales se muestran en el Cuadro 2.

3.4.1.1.6 Diseño experimental

El diseño experimental fue el factorial en bloques completamente al azar con cuatro repeticiones y la unidad experimental estuvo conformada por los 4 explantes en cada una de las especies, los factores fueron las dos especies, Cass y Arrayán; la condición o ambiente de crecimiento de los explantes, sol y sombra; y el tiempo de desinfección.

Cuadro 2. Tratamientos de tiempos de desinfección evaluados considerando dos especies, dos condiciones de crecimiento y cuatro tiempos de desinfección.

Número de tratamiento	Especie	Crecimiento de los brotes	Tiempo de desinfección (min)
1	Cass	sol	10
2	Cass	sol	15
3	Cass	sol	20
4	Cass	sol	25
5	Cass	sombra	10
6	Cass	sombra	15
7	Cass	sombra	20
8	Cass	sombra	25
9	Arrayán	sol	10
10	Arrayán	sol	15
11	Arrayán	sol	20
12	Arrayán	sol	25
13	Arrayán	sombra	10
14	Arrayán	sombra	15
15	Arrayán	sombra	20
16	Arrayán	sombra	25

3.4.1.1.7 Variables evaluadas

La evaluación se hizo a los 10 días después de la siembra de los explantes. Ésta fue visual y se hizo aplicando un valor cualitativo según la variable.

Contaminación por hongos o bacterias. Se consideró el valor de 0 cuando no hubo presencia de contaminación y 1 cuando hubo contaminación.

Oxidación por fenoles. Esta evaluación se dividió en dos, primero la oxidación o necrosamiento por fenoles 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 = nada, 2 = poco y 3 = mucho) dependiendo de la cantidad o ausencia de fenoles tanto en el explante como en el medio de cultivo.

3.4.2 Multiplicación *in vitro* de Cass (*P. friedrichsthalianum*)

La etapa de multiplicación solo se hizo con Cass, dado que de esta especie se tenía material vegetal suficiente, mas no para Arrayán.

3.4.2.1 Efecto de bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (GA₃) sobre la brotación, en la etapa de multiplicación

Para evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento BAP y GA₃ en la multiplicación *in vitro* de los brotes de Cass (*P. friedrichsthalianum*) se realizó el siguiente experimento. Se inició con el establecimiento de nuevos explantes a partir del tipo de explante y el tiempo de desinfección que mejor respuesta tuvieron en el experimento anterior. Se utilizaron aproximadamente 100 brotes juveniles de árboles madre sombreados (longitud de aproximadamente 2 cm), ya que estos brotes presentaron los menores problemas de oxidación por fenoles durante el

establecimiento. Los brotes fueron colectados en la solución antioxidante PVPP al 5 %, y trasladados al laboratorio, en donde se lavaron y desinfectaron con hipoclorito de calcio durante 25 minutos, y se implantaron en un medio semisólido de establecimiento, similar al del experimento anterior. Durante la etapa de establecimiento se realizaron dos subcultivos en medio fresco con las mismas características del medio inicial. Los explantes permanecieron en el medio de establecimiento por 60 días, tiempo en el cual se presentaron las condiciones para pasar a la etapa de multiplicación del cultivo *in vitro*.

3.4.2.2 Descripción de los tratamientos

Trascurridos 60 días del establecimiento se transfirieron los explantes a frascos con 25 ml de medio sólido de multiplicación con dos variantes del mismo; la primera fue: sales MS suplementadas con sacarosa 30 g.L⁻¹, myo-inositol 10 ml.L⁻¹, tiamina 1ml.L⁻¹ y BAP 0.5 ml.L⁻¹; y la segunda variación del medio fue igual que la primera más GA₃ 30 µL. Se consideraron dos tipos de explantes para cada una de las variantes del medio, los cuales fueron aquellos provenientes de ápices y de nudos en cada uno de los tratamientos, como se muestra en el Cuadro 3 (de longitud de 6 a 15 mm, tanto de ápices como de nudos y de 2 a 5 nudos visibles), los explantes fueron medidos antes de colocarse en el frasco, se utilizaron 35 explantes por tratamiento y 7 explantes por frasco.

Cuadro 3. Tratamientos para multiplicación de Cass *in vitro* considerando las variantes en el medio de cultivo y los tipos de explante.

Número de tratamiento	Variantes del medio de cultivo	Tipo de explante
1	BAP + AG ₃	ápice
2	BAP + AG ₃	nudo
3	BAP	ápice
4	BAP	nudo

3.4.2.3 Diseño experimental

El diseño experimental fue factorial en bloques al azar con cinco repeticiones; la unidad experimental fue de 7 explantes, los factores a evaluar fueron las variantes del medio de cultivo y los tipos de explante de ápice y de nudo.

3.4.2.4 Variables evaluadas

La evaluación se hizo a los 30 días después de iniciar los tratamientos, considerando las variables: longitud del explante, número final de nudos, número de botes nuevos por explante, incremento en longitud, incremento en número de nudos por explante y coeficiente de multiplicación (CoM); esta variable se estimó con la ecuación:

$$\text{CoM} = \frac{\text{número de segmentos del tallo final}}{\text{número de segmentos del tallo inicial}}$$

Donde:

Incremento en longitud = diferencia entre la longitud final y la longitud inicial del explante; Incremento en número de nudos = diferencia entre el número de nudos final y el número de nudos inicial del explante.

3.4.3 Enraizamiento *in vitro* de Cass (*P. friedrichsthalianum*)

3.4.3.1 Efecto del ácido indolacético (AIA), del ácido naftalenacético (ANA) y de carbón activado sobre el enraizamiento *in vitro*

Para evaluar el efecto de los reguladores del crecimiento AIA y ANA sobre el enraizamiento de los brotes de Cass, se realizó el siguiente experimento. Se utilizaron explantes provenientes de la multiplicación *in vitro*, que fueron subcultivados por seis ocasiones en el mismo medio de multiplicación.

3.4.3.2 Descripción de los tratamientos

Los explantes utilizados (15 a 25 mm de longitud, con 3 a 5 nudos visibles) se colocaron en frascos que contenían 25 ml de cuatro variantes del medio sólido de enraizamiento, de la siguiente manera: a) sales MS suplementados con sacarosa 30 g.L⁻¹, myo-inositol 10 ml.L⁻¹ y tiamina 1 ml.L⁻¹. b) el mismo medio de a) más 2 g.L⁻¹ de carbón activado; c) sales MS suplementados con sacarosa 30 g.L⁻¹, myo-inositol 10 ml.L⁻¹, tiamina 1ml.L⁻¹, más los reguladores de crecimiento AIA 1 ml.L⁻¹ y ANA 1 ml.L⁻¹; y d) medio de cultivo igual que el c) más carbón activado 2 g.L⁻¹, (Cuadro 4). Se tuvieron 35 explantes por cada tratamiento y 7 explantes por frasco.

Cuadro 4. Tratamientos de enraizamiento de Cass *in vitro*, considerando las diferentes variantes del medio de cultivo.

Número de tratamiento	Medio de cultivo
1	MS
2	MS + Carbón Activo (CA)
3	MS + AIA + ANA
4	MS + AIA + ANA + CA

3.4.3.3 Diseño experimental

El diseño experimental fue bloques completamente al azar con cinco repeticiones y la unidad experimental fue de 7 explantes.

3.4.3.4 Variables evaluadas

La evaluación se realizó 30 días después de colocar los explantes en el medio de enraizamiento. Las variables registradas fueron la longitud final del explante, el número de brotes, el número final de nudos de cada explante, el número de raíces y la longitud de raíces, el incremento en longitud e incremento en el número de nudos. Las mediciones de la longitud se hicieron con la ayuda de papel milimétrico.

Se consideró el incremento en la longitud como la diferencia entre la longitud final y la longitud inicial del explante; el incremento en el número de nudos como la diferencia entre el número de nudos final y el número de nudos inicial del explante.

3.5 Análisis estadístico

Se aplicaron pruebas estadísticas para comprobar los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas; sin embargo, ninguno de estos supuestos se cumplieron en todas las etapas ni en las variables, por lo que se realizó la transformación de datos utilizando la fórmula $X' = \sqrt{x + 0.5}$ (donde X' = valor transformado; x = valor original) con el paquete estadístico SAS versión 9.2. A los datos transformados se les hizo un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha=0.05$). Se utilizó el programa SAS versión 9.2 (Statistical Analysis System). La ecuación utilizada para la transformación de datos ha sido utilizada por otros autores en trabajos similares (Concepción *et al.*, 2005).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Establecimiento *in vitro* de Cass (*P. friedrichsthalianum*) y Arrayán (*P. sartorianum*)

4.1.1 Tiempo de desinfección en brotes de plantas sombreadas y soleadas

De acuerdo con el análisis de varianza se encontraron diferencias altamente significativas entre especies para todas las variables evaluadas. Para contaminación por bacterias se encontraron diferencias significativas en el ambiente de crecimiento de la planta madre y el tiempo de desinfección de los explantes; sin embargo, el resto de las variables evaluadas tuvieron un comportamiento similar entre sí. La interacción especies x manejo de plantas madre x tiempo de desinfección mostró diferencias altamente significativas para ambas variables de contaminación (Cuadro 5).

En el Cuadro 6 se presentan los valores medios de las variables en estudio, en él se observa que la menor contaminación por hongos se presentó en la especie Cass al someterse a los tiempos mayores de desinfección (25 y 20 min) para ambos tipos de crecimiento de los explantes (sol y sombra); sin embargo, también se tuvo baja contaminación en el tiempo más bajo de desinfección (10 min) en explantes que crecieron expuestos directamente al sol; lo contrario al resultado obtenido por Ramírez y Salazar (1997) que lograron la asepsia en explantes de guayabo utilizando hipoclorito de calcio durante 15 min. Para la especie Arrayán la contaminación por hongos afectó más a los explantes que provenían de plantas madre expuestas directamente al sol, en todos los tiempos de desinfección (25, 20, 15 y 10 min), la menor contaminación (1.08) se encontró en los explantes que se obtuvieron de plantas madre bajo sombra y que se desinfectaron durante 15 min.

Cuadro 5. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables contaminación y oxidación por fenoles al exponer los explantes a diferentes tiempos de desinfección durante el establecimiento *in vitro* de Cass y Arrayán.

F.V.	G.L.	Contaminación		Oxidación por fenoles	
		Hongos	Bacterias	Medio de cultivo	Explante
Especie	1	0.412**	0.080**	0.300**	0.162**
Manejo de planta madre	1	0.009NS	0.012*	0.005NS	0.021NS
Tiempo de desinfección	3	0.002NS	0.009*	0.023NS	0.013NS
Especie x Manejo de la planta Madre x Tiempo desinfección	10	0.386**	0.131**	0.016NS	0.020NS
Error	48	0.009	0.002	0.018	0.015
Total	63				
C.V.		8.20	5.07	8.38	6.99

Especie = Cass y Arrayán; Manejo de planta madre = sol y sombra; F.V.= Fuente de variación; G.L.= Grados de Libertad; C.V. = Coeficiente de variación. **Altamente significativo con $\alpha \leq 0.01$, *Significativo con $\alpha \leq 0.05$, NS= No significativo

En lo que respecta a la contaminación por bacterias hubo diferencias significativas entre las especies; la más afectada fue el Arrayán, la contaminación más alta se encontró en explantes obtenidos de plantas madre expuestas directamente al sol con un tiempo de desinfección de 25 min y la contaminación más baja se presentó en los explantes provenientes de plantas madre expuestas al sol con el tiempo de desinfección más bajo (10 min) y en explantes de plantas madre crecidas bajo sombra con el tiempo de desinfección más alto (25 min).

En promedio hubo más contaminación por hongos que por bacterias en ambas especies. Los explantes de ambas especies presentan vellosidad en hojas y tallos, lo que hace que muchos microorganismos proliferen en la superficie (Acosta *et al.*, 2002), éstos, al estar en contacto con el medio de cultivo mantienen un crecimiento acelerado que consume los nutrientes del medio, afectando el desarrollo normal del explante; en el peor de los casos, los microorganismos contaminantes excretan toxinas y/o utilizan el contenido celular del explante como sustrato para su propio desarrollo (Leifert *et al.*, 1994). Por otro lado, las características morfológicas de los explantes, como la vellosidad, impiden la eficiente penetración del desinfectante, el cual necesita poseer una baja tensión superficial que le permita llegar a toda la

superficie, además, el desinfectante debe de estar en una concentración y un tiempo de acción suficiente que elimine los microorganismos y provoque el menor daño a los tejidos superficiales (Ramírez *et al.*, 1999). Sin embargo, aún con dicho nivel de contaminación por hongos y bacterias, se logró la obtención de explantes sanos utilizando hipoclorito de calcio al 1 %, considerándose como la opción buscada, ya que para la propagación *in vitro* de diversas especies leñosas es frecuente el uso de bicloruro de mercurio para lograr una buena desinfección; esta substancia es peligrosa para la salud humana y el ambiente (Anis *et al.*, 2005). En guayabo, el tiempo de desinfección con bicloruro de mercurio va de 2 a 15 min en concentraciones de 0.05 a 0.20 %, combinado con inmersiones en etanol 70 % (v/v) (Jaiswal y Amin, 1987). En el establecimiento *in vitro* de Cass se han utilizado diversos desinfectantes como nitrato de plata, bicloruro de mercurio e hipoclorito de sodio, en varias concentraciones y tiempos de desinfección, pero ninguno de éstos ha logrado controlar los microorganismos contaminantes presentes en los explantes (Ramírez *et al.*, 1999).

En lo que respecta a la oxidación por fenoles difundida al medio de cultivo no hubo diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 6); sin embargo, Cass fue la especie que más apariencia de oxidación por fenoles en el medio de cultivo tuvo (sombra, 20 min), la contaminación por hongos y bacterias en este tratamiento fue baja. Concepción *et al.* (2005) mencionan que en guayabo, donde se probó el efecto de tres antioxidantes (L-Cisteína, polivinilpolipirrolidona (PVPP) y la combinación de ácido ascórbico con ácido cítrico), la toxicidad de los fenoles exudados al medio por los explantes provocó que en los tratamientos donde la oxidación por fenoles fue superior, la contaminación fuera nula.

Para la variable oxidación de los explantes por fenoles no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 6) pero los valores más altos se encontraron en la especie Cass en ambos tipos de explantes, los que provenían de plantas madre expuestas al sol y bajo sombra (de sol 15 min y de sombra 10 min); contrario a lo reportado por Ocampo y Nuñez (2007) que a mayor tiempo de desinfección de explantes de guayaba mayor es la oxidación por fenoles. En Arrayán la mayor

concentración de fenoles fue en explantes de plantas madre expuestas directamente al sol, en todos los tiempos de desinfección (25, 20, 15 y 10 min). Sin embargo, en todos los tratamientos de desinfección para ambas especies se observaron índices de oxidación por fenoles sin diferencias estadísticas entre sí. Lo cual demuestra que la oxidación fenólica está más relacionada con las características propias de la especie que con el tratamiento de desinfección (León *et al.*, 1997).

Existen diversas estrategias para disminuir el oscurecimiento de los tejidos, por ejemplo el uso de antioxidantes en el medio. Concepción *et al.* (2005) mencionan que el uso de PVPP 0.5 % (M/V) es el antioxidante y la concentración más adecuados para utilizarse en el cultivo de tejidos *in vitro* de yemas de guayabo. Amin y Jaiswal (1988) encontraron que una manera de reducir la oxidación por fenoles es sumergir los explantes en una solución con PVPP, al momento de ser colectados de las plantas donadoras. Razón por la cual se utilizó PVPP en el experimento en cada uno de los tratamientos.

El porcentaje de sobrevivencia de los explantes estuvo muy relacionado con el grado de contaminación y oxidación por fenoles en ellos. En lo que respecta a las especies, la que mayor porcentaje de sobrevivencia presentó fue Cass, siendo 75 % el valor más alto y 19 % el más bajo índice de sobrevivencia (sombra, 25 min y sombra, 10 min, respectivamente). En Arrayán todos los explantes provenientes de plantas madre expuestas al sol murieron a causa de la contaminación y la oxidación por fenoles; el mayor índice de supervivencia fue de 56 % (sombra, 15 min) (Cuadro 6). Algunas investigaciones enfatizan la importancia de aplicar tratamientos al material donante, a modo de controlar o reducir la oxidación de los explantes. George (1996) indica que el coleccionar explantes de plantas madre etioladas, ya sea porque han crecido en total oscuridad, con intensidad de luz baja o incluso en días cortos, evita o reduce la oxidación por fenoles. Al respecto, Zavaleta *et al.* (2007) mencionan que en días con alta irradiación, la cantidad de energía lumínica recibida por los cloroplastos es mayor a la requerida para la fijación del CO₂ durante la fotosíntesis, los excesos de energía son entonces captados por aceptores de electrones alternos, estimulando la formación de ROS (radicales libres que se producen a partir del metabolismo del

oxígeno), que trae consigo la acción de enzimas oxidasas (PPOs), fenolasas y tirosinasas, así como las peroxidasas (POX), las cuales son sintetizadas, liberadas o están presentes en ciertos sustratos y en condiciones oxidativas, cuando los tejidos son lesionados o se encuentran senescentes, dando como resultado la muerte del explante (Azofeita, 2009). En guayabo, León *et al.* (1997) mencionan que la supervivencia de los explantes está afectada por la exposición de las plantas donantes a la irradiación solar; observaron mayor sobrevivencia en los explantes tomados de plantas crecidas en oscuridad o en baja intensidad de radiación.

Cuadro 6. Comparación de medias para los explantes de sol y sombra con diferentes tiempos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de Cass y Arrayán.

Especie* Manejo de planta madre*	Contaminación		Oxidación por fenoles		sobrevivencia %
	Hongos	Bacterias	Medio de cultivo	Explante	
Tiempo de desinfección					
Cass Sol 25 min	1.11 ab	1.00 c	1.62 a	1.72 a	50
Cass Sol 20 min	1.05 b	1.00 c	1.67 a	1.79 a	50
Cass Sol 15 min	1.21ab	1.00 c	1.63 a	1.90 a	38
Cass Sol 10 min	1.05 b	1.00 c	1.74 a	1.78 a	44
Cass Sombra 25 min	1.08 b	1.00 c	1.63 a	1.78 a	75
Cass Sombra 20 min	1.08 b	1.00 c	1.83 a	1.81 a	50
Cass Sombra 15 min	1.22 ab	1.05 bc	1.65 a	1.81 a	31
Cass Sombra 10 min	1.19 ab	1.00 c	1.80 a	1.95 a	19
MEDIA	1.12	1.00	1.69	1.81	45
Arrayán Sol 25 min	1.24 ab	1.22 a	1.57 a	1.74 a	0

Arrayán Sol 20 min	1.34 a	1.14 ab	1.59 a	1.81 a	0
Arrayán Sol 15 min	1.36 a	1.08 abc	1.60 a	1.74 a	0
Arrayán Sol 10 min	1.36 a	1.00 c	1.54 a	1.79 a	0
Arrayán Sombra 25 min	1.36 ab	1.00 c	1.53 a	1.67 a	12.5
Arrayán Sombra 20 min	1.29 ab	1.05 bc	1.61 a	1.65 a	19
Arrayán Sombra 15 min	1.08 b	1.08 abc	1.55 a	1.67 a	56
Arrayán Sombra 10 min	1.24 ab	1.02 bc	1.49 a	1.65 a	38
MEDIA	1.28	1.07	1.56	1.71	16
DMS	0.25	0.13	0.34	0.31	
MEDIA GENERAL	1.21	1.04	1.63	1.77	28
C.V.	8.20	5.07	8.38	6.99	

Especie = Cass y Arrayán; Manejo de planta madre = sol y sombra; Valores con la misma letra dentro de la misma columna no presentan diferencias significativas (Tukey $\alpha=0.05$). DMS = Diferencia Mínima Significativa; C.V.= Coeficiente de variación.

4.2 Multiplicación *in vitro* de Cass (*P. friedrichsthalianum*)

4.2.1 Efecto de bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (GA3) sobre la brotación, en la etapa de multiplicación

De acuerdo con el análisis de varianza (Cuadro 7) no se encontraron diferencias significativas en los tratamientos del medio de cultivo con regulares de crecimiento en ninguna de las variables evaluadas. Sin embargo, para el tipo de explante (de ápice o de nudo) hubo diferencias altamente significativas para las variables longitud del explante, número final de nudos, coeficiente de multiplicación, incremento en longitud e incremento en número de nudos. Con respecto a la interacción medio de

cultivo x reguladores de crecimiento x tipo de explante (de ápice o de nudo) no se encontraron diferencias significativas para ninguna de las variables.

Cuadro 7. Cuadrados medios y niveles de significancia para diferentes variables al incorporar al medio de multiplicación dos reguladores de crecimiento y utilizando dos tipos de explantes.

F.V.	G.L.	Longitud del explante	No. final de nudos	No. de brotes nuevos	CoM	Incremento en longitud	Incremento en No. de Nudos
Medio de cultivo + RC	1	0.009NS	0.0003NS	0.044NS	0.017NS	0.005NS	0.048NS
Tipo de explante	1	0.223**	2.170**	0.018NS	0.155**	0.314**	0.944**
Variantes de medio*Tipo de explante	1	0.003NS	0.031NS	0.007NS	0.003NS	0.001NS	0.063NS
Error	16	0.002	0.009	0.023	0.017	0.002	0.016
Total	19						
C.V.		3.54	4.60	7.35	5.78	4.14	10.51

RC = Reguladores de crecimiento BAP + GA₃ o BAP; Tipo de explante = de nudo o de ápice; CoM = Coeficiente de Multiplicación; F.V. = Fuente de variación; G.L. = Grados de libertad; C.V. = Coeficiente de variación. **Altamente significativo con $\alpha \leq 0.01$, *Significativo con $\alpha \leq 0.05$, NS = No significativo.

En el Cuadro 8 se presentan los valores promedio de las variables en estudio, en él se observa que los explantes con mayor longitud (157 mm en promedio) fueron los provenientes de ápices; y los valores más bajos los que se obtuvieron de los nudos (136 mm), debido a que los explantes de nudo emitieron más brotes y el explante principal no creció. Para la variable número de brotes no se encontraron diferencias significativas; sin embargo, el valor más alto fue el del tratamiento del medio de cultivo más BAP y el explante de nudo. El BAP al ser una citocinina promueve la brotación axilar de los explantes, por eso el BAP es la hormona que más se utiliza

para obtener mayor brotación en los explantes de guayaba (Jaiswal y Amin, 1987; Rodríguez *et al.*, 2006; Chandra y Mishra, 2007; Rai *et al.*, 2009). Pérez *et al.* (2002) mencionan que el uso de otras citocininas como el TDZ produce brotes atrofiados, achaparrados y amarillentos. En lo que respecta a la variable coeficiente de multiplicación (CoM) no hubo diferencias significativas, pero el valor más alto se encontró en el medio de cultivo más BAP y del explante proveniente de ápice, lo que coincide con Pérez *et al.* (2002) quienes encontraron los mejores resultados al multiplicar guayaba de la variedad EEA 18-40 usando explantes de ápice, logrando un coeficiente de multiplicación de 4.03.

Cuadro 8. Comparación de medias de cada una de las variables utilizando dos medios de cultivo y dos tipos de explantes durante la etapa de multiplicación *in vitro* de Cass.

Medio de cultivo +RC y Tipo de explante	Longitud final (mm)	No. de Nudos Final	No. de Brotes	CoM	Incremento en Longitud (mm)	Incremento en No. de Nudos (mm)
BAP+AG ₃ , ÁPICE	161 a	2.48 a	1.98 a	2.31 a	128 a	154 a
BAP, ÁPICE	154 a	2.39 a	2.11 a	2.40 a	123 a	133 a
MEDIA	157	2.43	2.04	2.35	125	143
BAP+AG ₃ , NUDO	137 b	1.74 b	2.08 a	2.16 a	101 b	100 b
BAP, NUDO	135 b	1.81 b	2.14 a	2.16 a	100 b	101 b
MEDIA	136	1.77	2.11	2.16	100	100
DMS	009	0.17	0.27	0.23	0.08	0.23
C.V.	3.54	4.60	7.35	5.78	4.14	10.51
MEDIA GENERAL	147	2.11	2.08	2.26	113	122

RC = Reguladores de crecimiento BAP + GA₃ o BAP; Tipo de explante = nudo o ápice; Valores con la misma letra dentro de la misma columna no presentan diferencias significativas (Tukey $\alpha=0.05$). DMS = Diferencia Mínima Significativa C.V.= Coeficiente de variación.

4.3 Enraizamiento *in vitro* de Cass (*P. friedrichsthalianum*)

4.3.1 Efecto de los reguladores de crecimiento ácido indolacético (AIA) y Ácido Naftalenacético (ANA), y uso de carbón activado, sobre el enraizamiento *in vitro*

De acuerdo al análisis de varianza (Cuadro 9), se encontraron diferencias significativas en las variables número final de nudos e incremento en el número de nudos, en las distintas variantes del medio de cultivo. En el resto de las variables no se encontraron diferencias significativas.

Cuadro 9. Cuadrados medios y niveles de significancia para las diferentes variables utilizando variantes en el medio de cultivo para el enraizamiento *in vitro* de Cass.

FV	G.L.	Longitud final	No. final de nudos	No. de brotes	No. de raíces	Longitud de raíz	Incremento en longitud	Incremento en No. de Nudos
Medio de cultivo	3	0.005NS	0.259*	0.002NS	0.006NS	0.002NS	0.101NS	0.280**
Error	16	0.004	0.068	0.002	0.006	0.001	0.004	0.030
Total	19							
C.V.		3.7	10.7	4.8	7.7	3.9	5.3	10.6

F.V. = Fuente de variación; G.L. = Grados de libertad; C.V. = Coeficiente de variación. **Altamente significativo con $\alpha \leq 0.01$, *Significativo con $\alpha \leq 0.05$, NS= No significativo.

En el Cuadro 10, sobre comparación de medias, se observa que para la variable número final de nudos hubo diferencias significativas, siendo en el medio MS donde se observó el valor más alto; en contraste, el valor más bajo se encontró en el medio MS+ANA+AIA. Para las variables longitud final del explante, número de brotes, incremento en longitud del explante e incremento en número de nudos no hubo diferencias significativas; sin embargo, el valor más alto se observó en el medio de

cultivo MS. En la variable número de raíces no se encontraron diferencias significativas pero el mayor número de éstas se dio en los medios de cultivo MS+CA y MS+ANA+AIA+CA. La longitud de raíz fue mayor en el medio de cultivo MS+ANA+AIA+CA.

El uso de auxinas en el enraizamiento *in vitro* de guayabo está señalado en la literatura (Jaiswal y Amin, 1987); estos autores lograron el enraizamiento eficiente con el empleo de AIB y ANA a una concentración de 0.2 mg.L^{-1} cada uno. Rodríguez *et al.* (2006) también enraizaron brotes de guayabo de la variedad 'Cotorrera' agregando $0.98 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AIB, $1.14 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AIA y 1 g.L^{-1} de carbón activado (CA) al medio de cultivo. Sin embargo, en brotes de guayabo de la variedad EEA-18, obtenidos a partir de semillas germinadas *in vitro*, el enraizamiento se logró en un medio MS sin reguladores de crecimiento (Pérez, 2000).

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

En el medio sin reguladores de crecimiento también hay enraizamiento, el cual puede estar relacionado con el balance hormonal endógeno de los brotes, favorable a la auxinas (Ali *et al.*, 2003). El AIA (auxina natural) se sintetiza en las hojas jóvenes y ápices de crecimiento y se transporta basípetamente en el tallo mediante difusión polar quimiosmótica (transporte polar de auxinas) en tejidos asociados con el sistema vascular, especialmente por el floema (Marks *et al.*, 2002). De esta forma los ápices son capaces de producir suficientes cantidades de AIA que permita inducir el desarrollo de raíces en un medio libre de reguladores de crecimiento.

El carbón activado ayuda a que los nutrientes y reguladores de crecimiento para que sean mejor absorbidos por los explantes; sin embargo, su uso en cada uno de los tratamientos no fue significativo, quizá se necesite mayores dosis.

Cuadro 10. Comparación de medias para diferentes variantes de medio de cultivo en el enraizamiento *in vitro* de Cass.

Variantes del medio de cultivo	Longitud final del explante (mm)	No. final de nudos	No. de brotes	No. de raíces	Longitud de raíz (mm)	Incremento en longitud del explante (mm)	Incremento en No. de nudos
MS+CA	182 a	2.46 ab	1.04 a	1.06 a	102 a	130 a	1.64 a
MS+ANA+AIA+CA	180 a	2.55 ab	1.01 a	1.06 a	104 a	130 a	1.68 a
MS+ANA+AIA	176 a	2.14 b	1.00 a	1.11 a	103 a	123 a	1.32 b
MS	184 a	2.68 a	1.05 a	1.02 a	100 a	134 a	1.89 a
Media	1.81	2.46	1.03	1.07	103	130	1.64
DMS	0.122	0.474	0.090	0.149	0.074	0.126	0.313
C.V.	3.745	10.661	4.858	7.729	3.988	5.369	10.57

MS= medio MS, CA= Carbón Activado, ANA = Ácido Naftalenacético), AIA = Ácido Indolacético. Valores con la misma letra dentro de la misma columna no presentan diferencias significativas (Tukey $\alpha=0.05$). DMS = Diferencia Mínima Significativa. C.V. = Coeficiente de variación.

V. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que:

- Fue posible establecer una metodología eficiente para el establecimiento *in vitro* de los portainjertos para guayabo. En Cass (*P. friedrichsthalianum*) el mayor porcentaje de supervivencia (75 %) se obtuvo al usar explantes que crecieron bajo sombra y con un tiempo de desinfección de 25 min. En Arrayán (*P. sartorianum*) el mayor porcentaje (56 %) se logró al establecer explantes de plantas madre que crecieron bajo sombra con un tiempo de desinfección de 15 min.
- Aunque no se encontraron diferencias significativas de la oxidación por fenoles en los explantes, se observó que los que provenían de plantas madre sombreadas tuvieron mayor porcentaje de sobrevivencia.
- Se estableció una metodología para la multiplicación *in vitro* de Cass (*P. friedrichsthalianum*). Los mejores resultados se obtuvieron al utilizar explantes de ápice; la mayor longitud y el mayor número de nudos se observó en el tratamiento de medio de cultivo MS+ BAP+ AG₃; sin embargo, el mayor número de brotes y mejor coeficiente de multiplicación se obtuvo en el tratamiento de medio de cultivo MS+BAP.
- Se estableció una metodología para el enraizamiento *in vitro* de Cass (*P. friedrichsthalianum*). Aunque no hubo diferencias significativas en el número de raíces se observó que la mayor cantidad se alcanzó al utilizar un medio de cultivo MS+ANA+AIA; sin embargo; los explantes más vigorosos (mayor longitud, más número de nudos y mayor número de brotes) se obtuvieron al utilizar el medio de cultivo MS solo, aunque el enraizamiento fue menor.
- El uso de carbón activado no fue necesario para el enraizamiento *in vitro* de Cass pues no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelwahd, R; Hakam, N; Labhilili, M; UduPA, S. 2008. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics *in vitro* plantlet regeneration of fababean. African Journal of Biotechnology 7: 997-1002.
- Acosta, M.; Caballero, I.; Alvarado, Y.; Leiva, M. 2002. Microbiota epifítica y contaminantes fungosos del establecimiento *in vitro* de la guayaba (*Psidium guajava* L.). Biotecnología Vegetal 2 (2): 67-71.
- Ali, B.N.; Mulwa, R.M.S.; Norton, M.A.; Skirvin, R.M. 2003. Micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.). J. Hort. Sci. Biotech. 78 (5): 739-741.
- Alvarado, Y .1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En: Pérez Ponce, J.N. (Ed), Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. Cap. 5 pp 81-104.
- Amin, M. N.; Jaiswal, V. S. 1988. Micropropagation as an aid to rapid cloning of a guava cultivar. Scientia Hort. 36: 89-95.
- Anis, M.; Husain, M.K.; Shahzad, A. 2005. *In vitro* plantlet regeneration of *Pterocarpus marsupium* Roxb, an endangered leguminous tree. Current Science 88 (6): 861-863.
- Andreu, P.; Marín, J.A. 2005. *In vitro* culture establishment and multiplication of the *Prunus* rootstock 'Adesoto 101' (*P. insititia* L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. Scientia Horticulturae 106 (2): 258-267.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agronomía Mesoamericana 20: 153-175.
- Barker, P.K.; de Fossard R.A.; Bourne R.A. 1979. Progress towards clonal propagation of *Eucalyptus* species by tissue culture techniques. Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 27: 546-556.
- Barbeau, G. 1990. Frutas tropicales en Nicaragua. Ed. Ciencias Sociales. Dirección General de Técnicas Agropecuarias. Managua, Nicaragua. 397 p.

- Bourke, O. D. D. 1975. *Psidium guajava* L. guava. Commonwealth bureau of horticulture and plantation crops. New York, USA. p. 530-553.
- Bray, E; Bailey-Serres, J; Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stresses. *In*: Buchanan, B; Gruissem, W; Jones, R. eds. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. p. 1158-1203.
- Chacón, G; Gómez, L. 1996. Micropropagación de una variedad local de mora (*Rubus* sp.) *In*: Memoria X Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales, III Congreso Nacional de Fitopatología, II Congreso Nacional de Suelos. Volumen I. EUNED, EUNA. San José, Costa Rica. p 303.
- Chandra, R; Mishra, M. 2007. Biotechnological interventions for improvement of Guava (*Psidium guajava* L.) *Acta Hort.* 735.
- Claudebon, M.; M. Gendraud; A. Franclet. 1988. Roles of phenolic compounds on micropropagation of juvenile and mature clones of *Sequoiadendron giganteum*: Influence of activated charcoal. *Scientia Hort.* 34: 283-291.
- Concepción, L.O.; Nápoles, B.L.; Pérez, M. A.; Hernández, M.; Peralta, N.; Trujillo, S.R. 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.
- Concepción, L.O.; Nápoles, B.L.; Pérez, M. A.; Peralta, B. N.; Trujillo, S. R. 2004. Regeneración de brotes adventicios en hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.) cultivadas *in vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 6: 54-61.
- Cubero, S. J. I. 2002. Introducción a la mejora genética vegetal. Mundi Prensa. España. 565 p.
- El- Baradi, T. A. 1975. "Guava: review article". *Abstr. Trop. Agric.* 1: 9-16.
- FAO, 2005. Committee on Commodity Problems. Intergovernmental group on bananas and tropical fruits. Fourth Session. Guayaquil, Ecuador, 19 – 23 September 2005. Market profile on tropical fruits in India. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/meeting/009/j5642e.htm>
- Fitchet, M. 1990. Tissue culture of guava. *Horticultural Abstr.* 60 (2): 1500.

- Galletta, G. J. 1988. Manejo de polen y semillas. In: Moore, J. N. y Janick, J. Métodos genotécnicos en frutales. Traducido por: Raúl Mosqueda Vázquez. AGT Editor S. A. México: 27 -61.
- George, E. 1996. Plant propagation by tissue culture. Part 2. In Practice. 2 ed. Exegetics Limited. England. 1361 p.
- George, E. F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Exegetics Ltd. 524p.
- George, E. F.; Hall, M. A.; De Klerk, G. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. Ed. Springer. Holanda. 504 p.
- González, G. E.; Padilla, R. S.; Reyes, M. L.; Perales, C. M. A.; Esquivel, V. F. 2002. Guayaba su cultivo en México. INIFAP. Aguascalientes, México. 182 p.
- González, G. E.; Esquivel, V.; Perales, C. M.A. y Padilla, R. J.S. 1999. Acodo aéreo en guayabo. SAGAR. INIFAP. Desplegable No. 29.
- Hartmann, H. T. y Kester, E. D. 1971. Propagación de plantas. Principios y práctica. Traducido por: Antonio Marino. Ed. C.E.C.S.A. México, D.F. p. 141-223.
- Hayes, W. B. 1960. The guava and its relatives. Fruit growing in India. 3ra Edition, Kitabistan, AllaHabad, India. pp. 283-299.
- Hildebrandt, V.; P. M. Harney. 1988. Factors affecting the release of fenolic exudate from explants of *Pelargonium x hortorum*, Bailey Sprinter Scarlet . J. Hort. Sci. 63: 651-657.
- Jaiarj, P.; Khoohaswan, P.; Wong Krajang, Y.; Peungvichia, P.; Suriyawong, P.; Saraya, M.L.; Ruangsomboon, O. 1999. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. leaf extract. J. Ethnopharmacol. 67(2): 203-212.
- Jaiswal, V. S.; Amin, M. N. 1987. *In vitro* propagation of guava from shoot culture of mature trees. Plant Phisiol. 130: 7-12.
- Jankiewicz, L. S. 2003. Reguladores del crecimiento, desarrollo y resitencia en plantas. Propiedades y acción. Ediciones Mundi-prensa. México. 487 p.

- Keller, E.R.J.; Senula, A.; Leunufna, S.; Grübe, M. 2006. Slow growth storage and cryopreservation-tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *International Journal of Refrigeration* 29 (3): 411-417.
- Khattak, M.S.; Malik, M.N.; Khan, M.A. 2001. Macro-propagation of Guava (*Psidium guajava* L.). *Journal of Biological Sciences* 1 (3): 111-112.
- Leifert, C.; E. C. Morris; M. Waites Will. 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue and field grown plant: Reasons for contaminations problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13 (2): 139-183.
- León, S.; Arenas, L. y Viloría, Z. 1997. Efecto de la exposición solar de las plantas donantes en la iniciación del cultivo *in vitro* de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 14: 47-53.
- León, J. 1987. *Botánica de los cultivos tropicales*. Ed. IICA. San José. C. R. 445 p.
- Litz, R.E; Jaiswal, V.S. 1991. Micropropagation of tropical and subtropical fruits. En: Deberg, P.C.; Zimmerman, RH (Eds.). *Micropropagation*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 247-263.
- Liu, G.; Bao, M. 2003. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of London plane tree (*Platanus acerifolia* Willd.) *Plant Cell Reports* 20 (7): 640-644.
- Loh, C. S.; Rao, A. N. 1989. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from seedlings and grafted plants and adventitious shoot formation *in vitro*. *Scientia Hort.* 39: 31-3.
- Lozoya, X.; Reyes-Morales, H.; Chávez-Soto, M.A.; Martínez-García, M. del C.; Soto-González, Y.; Doubova, S.V. 2002. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. *J. Ethnopharmacol.* 83 (1-2): 19-24.

- Manica, I. 2000. Propagação. Pp 85-112 *In*: Fruticultura tropical, goiaba. Manica I. (ed.). Ed. Cinco Continentes, Ltda., Porto Alegre, Brazil. 374 p.
- Marks, T.R.; Ford, Y.-Y.; Cameron, R.W.F.; Goodwin, C.; Myers, P.E.; Judd, H.L. 2002. A role for polar auxin transport in rhizogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 70: 189-198.
- Marks, T. R.; S. E. Simpson. 1990. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field- grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. *J. Hort. Sci.* 65 (2): 103-111.
- Mata, B. I.; Rodríguez, M. A. 2000. Cultivo y producción del guayabo. Ed. Trillas, D. F. México. 160 p.
- Merkle, S.A.; Parrott, W.A.; Flinn, B.S. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe, T.A. (ed.) *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands. pp. 155-203.
- Medina, M.L.; Pagano, F. 2003. Caracterización de la pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) tipo "Criolla Roja". *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 20: 72-86.
- Murashige, T. 1974. Plant Propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135-166.
- Ocampo, F.; Nuñez, V. M. 2007. Propagación *in vitro* de *Psidium guajava* mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 8 (1): 22-27.
- Ochse, J. J. 1976. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales, vol. I. Limusa. México.
- Ogita, S. 2005. Callus and cell suspension culture of bamboo plant *Phyllostachys nigra*. *Plant Biotechnology* 22: 119–125.

- Olmos, S.; Luciani, G.; Galdeano, E. 2004. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Echenique, V.; Rubinstein, C.; Mroginski, L. (eds.) Biotecnología y mejoramiento vegetal. Ediciones INTA. Buenos Aires. 446 p.
- Padilla, R. J. S. 2007. Colecta, caracterización, conservación y aprovechamiento del germoplasma mexicano de *Psidium guajava* L. pp. 119-125. *In*: Frutales nativos, un recurso fitogenético de México. Nieto, A. R. (editor). UACH, Chapingo, México.
- Padilla, R. J. S.; González, G. E.; Esquivel, V. F.; Mercado, S. E.; Hernández, D. S.; Mayer, P. N. 2002. Caracterización del germoplasma sobresaliente de guayabo de la región Calvillo-Cañones, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25 (4): 393-399.
- Pages, R. 2004. Fruits take their rightful place. *Granma Internacional*, Diciembre 30, 2004. (Edición digital en inglés). Disponible en: <http://www.granma.cu/ingles/2004/diciembre/juev30/51frutales.html>
- Papadatou, P.; Pontikis, C.A.; Ephtimiadou, E.; Lydaki, M. 1990. Rapid multiplication of guava seedlings by *in vitro* shoot tip culture. *Scientia Horticulturae* 45: 99-103.
- Pascual, L.; Marín, J.A. 2005. A liquid 2,4-D pulse increased shoot and root regeneration from leaf explants of adult *Prunus* rootstocks. *Scientia Horticulturae* 106 (4): 582-592.
- Peña, H. A.; Díaz, J. A.; Martínez T. R. 1996. *Fruticultura Tropical*. 2^{da} parte. ICFES. Santa Fe de Bogotá. Colombia. 208 p.
- Perales de la C. M. A. 2001. Métodos de injertos para el pistachero en Aguascalientes. Folleto para productores. Pabellón, Aguascalientes, México.
- Pérez, A. T.; Nápoles, L.; Concepción, O.; Trujillo, R. 2002. Multiplicación *in vitro* de brotes de guayabo (*Psidium guajava* L.) cv. Enana Roja Cubana obtenidos a partir de semillas. *Cultivos Tropicales* 23(3): 57-61.

- Pérez, T. O.; Egea, J.; Vanoostende A. y Burgos, L. 2000. Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. *Plant Science* 158: 61-70.
- Popenoe, W. 1974. *Manual of tropical and subtropical fruits: excluding the banana, coconut, pineapple, citrus fruits, olive and fig.* Reimpreton. Ed. Por Hafner Press. New York, USA. 474p.
- Rai, M. K.; Jaiswal, V. S.; Jaiswal, U. 2009. Shoot multiplication and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) from nodal explants of *in vitro* raised plantlets. *Journal of fruit and ornamental plant research* 17(1): 29-38.
- Ramírez, V. M.; León, S. S.; Urdaneta, F. A. 1999. Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Nierdz. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 16: 243-255.
- Ramírez, M.C.; Salazar, E.G. 1997. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 14: 497-506.
- Ramírez, M.C.; Salazar, E.G. 1998. Cultivo *in vitro* de embriones inmaduros del guayabo (*Psidium guajava* L.) *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 15: 211-221.
- Rodríguez, N.N.; Velázquez, B.; Cabrera, I. 2006. Multiplicación *in vitro* de *Psidium guajava* L. 'Cotorrera' a partir de explantes nodales. *Revista CITRIFRUT* 23 (2): 45-52.
- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Consultado 18 de noviembre de 2009. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/>.
- Sánchez, V. P.E. 1990. Myrtaceae. *Flora de Veracruz, México* 62: 1–146.
- Smith, C. E. 1988. Evidencia arqueológica actual sobre los inicios de la agricultura en América. *In: L. Manzanilla (Ed.). Coloquio V. Gordon Childen.* IIA, UNAM. México. pp 91-112.

- Souza, P. R. A.; Villanueva, A. H. J.; Galáz, A. R.; Loyola, V. V. M. y Zúñiga, A. 2003. La vía de las map cinasas se activa durante el inicio de la embriogénesis somática en *Coffea canephora*. Centro de Investigación Científica de Yucatán. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant 40: 95-101.
- Sytsma, K.J.; Litt, A. 2002. Tropical disjunctions in and among the *Myrtaceae* clade (*Myrtaceae*, *Heteropyxidaceae*, *Psiloxylaceae*, *Vochysiaceae*): Gondwanan vicariance or dispersal? (Abstract). Botany 2002 Conference, University of Wisconsin, Madison, WS, USA, August 4-7.
- Thomas, P; Ravindra, M. 1997. Shoot tipculture in mango: influence of medium, genotype, explant factor, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. Journal of Horticultural Science 72: 713-722.
- Tian L.; Wang, H.; Wu, K.; Latoszek-Green, M.; Hu, M.; Miki, B.; Brown, D.C.W. 2002. Efficient recovery of transgenic plants through organogenesis and embryogenesis using a cryptic promoter to drive marker gene expression. Plant Cell Reports, 20:1181–1187.
- Tong, K. L.; Khay, C. K. 1990. Guava in Malasia, production, pests and diseases. Tropical Press SDN. BHD. Malaysia. 260 p.
- Vida, G. 1994. Global issues of genetic diversity. In: Conservation Genetics. Germany. 440p.
- Vieitez, A. M.; E. Vieitez. 1980. Plantlet formation from embryonic tissue of chestnut grown *in vitro*. Physiol. Plant. 50: 127-130.
- Wilson, P.G.; O'Brien, M.M.; Gadek, P.A.; Quinn, C.J. 2001. Myrtaceae revisited: A Reassessment of infrafamilial groups. Amer. J. of Botany 88 (11): 2013–2025.
- Yadava, L. U. 1996. Guava production in Georgia under cold-protection structure. p. 451-457. In: J. Janick (ed.), Progress in new crops. ASHS Press, Arlington, VA.

Zavaleta, H; López H; Loza, H; Mora, M; Trevilla, C; Vargas, M; Ougham, H. 2007. Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *Journal of Plant Physiology* 164: 1572-1582.

Zeledon, R; Wan, F. J. 1994. El cultivo de la guayaba. Cañas Guanacaste, Costa Rica. Costa Rica. 85 p.