



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GENÉTICA

**PROPAGACIÓN *in vitro* DE SELECCIONES DE GUAYABO
(*Psidium guajava* L.) Y SU RESPUESTA A HORMONAS
Y PERIODOS DE SUBCULTIVO.**

LUIS ANTONIO DOMÍNGUEZ PERALES

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

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2011

La presente tesis, titulada: **Propagación *in vitro* de selecciones de guayabo (*Psidium guajava* L.) y su respuesta a hormonas y periodos de subcultivo**, realizada por el alumno: Luis Antonio Domínguez Perales, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO 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 SELECCIONES DE GUAYABO (*Psidium guajava* L.) Y SU RESPUESTA A HORMONAS Y PERIODOS DE SUBCULTIVO

Luis Antonio Domínguez Perales, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2011

La obtención de plantas de guayabo a partir de métodos de propagación como: hijuelos de raíz o por semilla, afecta sus rendimientos y su sanidad, considerando también que la propagación a partir de semillas genera una gran variación en la forma, tamaño y calidad de los frutos. La regeneración *in vitro* de plantas completas de guayabo puede ser la alternativa o complemento perfecto de los métodos convencionales de propagación, al obtener plantas a gran escala, uniformes y libres de microorganismos. En esta investigación se desarrollaron protocolos para la propagación *in vitro* de dos selecciones de *Psidium guajava* L. A partir de brotes obtenidos *in vitro* se consiguió establecer una metodología para su multiplicación en medio basal MS adicionado con sacarosa $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, mio-inositol $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, tiamina HCl $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y cuatro concentraciones distintas de 6-bencilaminopurina(BAP): 0.0, 2.2, 4.4 y $6.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Con la concentración de $4.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP se obtuvieron los mejores resultados para la selección Roja Exterior Redonda, donde se tuvieron 1.69 brotes en promedio y una longitud de brotes promedio de 117 mm. Para la selección 17-06, los resultados más sobresalientes se obtuvieron con la concentración de $2.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, ya que el número y la longitud de los brotes aumentaron en 46 y 15 %, respectivamente, comparados con el testigo (sin BAP). Para evaluar el efecto del tiempo de subcultivo en la selección Roja Exterior Redonda se utilizó medio basal MS adicionado con la mejor concentración de BAP ($2.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Se observó que 45 días de tiempo de subcultivo favoreció el crecimiento y desarrollo de los explantes. De igual manera, se evaluó la respuesta del enraizamiento de explantes de guayabo expuestos al medio basal MS adicionado con dos reguladores de crecimiento de efecto auxínico: ácido indolacético (AIA) y ácido naftalenacético; el uso de AIA promovió numéricamente un incremento en la cantidad y la longitud de las raíces (1.69 y 116 mm, respectivamente) presentando 50 % de brotes con raíces.

Palabras clave: *Psidium guajava* L., micropropagación, organogénesis directa.

In vitro PROPAGATION OF SELECTIONS OF GUAVA (*Psidium guajava* L.) AND ITS
RESPONSE TO HORMONES AND SUBCULTURE PERIOD

Luis Antonio Domínguez Perales, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2011

Most of the guava plantations in Mexico have been established with conventional propagation methods, such as the production of plants from root tillers or by seed, which affects the performance and health. In addition, the propagation from seed generates great variation in shape, size and quality of fruit. That is why the *in vitro* regeneration of whole plants of guava may be the perfect alternative or complement to obtain uniform and free of microorganisms plants on a large-scale. In this research we developed protocols for *in vitro* culture of two selections of *Psidium guajava* L. By using shoots obtained *in vitro* we were able to establish a methodology for their *in vitro* multiplication in MS medium supplemented with 30 g·liter⁻¹ sucrose, 100 mg·liter⁻¹ myo-inositol, 1.0 mg·liter⁻¹ thiamine and four concentrations of 6-benzylaminopurine (0.0, 2.2, 4.4 and 6.6 µmol·liter⁻¹). The best results were achieved with a concentration of 4.4 µmol·liter⁻¹ BAP for the cultivar Roja Exterior Redonda, where the average number of outbreaks was 1.69 of three explants compared with control treatment (without BAP) with only 1.15 shoots with 117 mm of average length. In the case of the cultivar 17-06, the more outstanding results were obtained with the concentration of 2.2 µmol·liter⁻¹, as the number and length of shoots increased by 46 and 15% respectively, compared with the control treatment (without BAP). To evaluate the effect of time of subculture on the selection Roja Exterior Redonda, MS basal medium was used supplemented with the best concentration of BAP (2.2 µmol·liter⁻¹). It was noted that 45 days of subculture time favored the growth and development of the explants. Similarly, we assessed the response of the rooting of guava explants exposed to MS medium supplemented with two growth regulators with auxinic effect: indoleacetic acid (IAA) and naphthaleneacetic acid, IAA promoted an increase in the quantity and the length of roots (1.69 and 116 mm, respectively), showing 50% of shoots with roots.

Key words: *Psidium guajava* L., *in vitro* culture, shoot regeneration.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme dado la oportunidad y la fuerza para concluir uno más de mis objetivos en la vida.

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

A Fundación Produce Zacatecas A.C., por el financiamiento 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 Dr. Ricardo Lobato Ortiz, por la dedicación, el esfuerzo y el tiempo que me brindaron para la conclusión de esta investigación.

Agradezco a todos los docentes e investigadores del Colegio de Postgraduados por su apoyo y conocimientos que me brindaron durante mi formación académica.

Al Dr. Oscar Concepción Laffite, a la Msc. Lelurllys Nápoles Borrero y a la Msc. Mariela Cid Ruiz, del Centro de Bioplantas, Ciego de Ávila, Cuba. Por su apoyo y consejos durante este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres José Luis y Blanca, por su apoyo incondicional que me han brindado durante toda mi vida.

A mi hermano Daniel por su compañía y amistad que me ha dado.

A Blanca Berenice por su apoyo y compañía, además por todas las cosas maravillosas que hemos vivido juntos.

A todos mis amigos que me han brindado una amistad sincera: Vany, Cesar, Rebeca y Martin.

A mis compañeros y amigos del Colegio en especial a Javier y Gaby.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo general	3
1.1.1 Objetivos Particulares	3
1.2 Hipótesis	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Origen	4
2.2 Clasificación taxonómica y morfología de <i>Psidium guajava</i> L.....	4
2.3 Importancia de la Fruticultura en México	5
2.4 Países productores de guayaba y producción en México	5
2.5 Métodos de propagación de guayabo	6
2.5.1 Propagación sexual	6
2.5.2 Propagación vegetativa de guayabo	7
2.6 Micropropagación	8
2.6.1 Morfogénesis <i>in vitro</i>	8
2.6.2 Factores que afectan los procesos morfogénicos.....	9
2.7 Micropropagación de guayabo	14
2.7.1 Factores que afectan la micropropagación de guayabo.	15
2.7.2 Efecto de las hormonas en el cultivo <i>in vitro</i> de guayabo	16
2.7.3 Influencia del periodo de subcultivo en la propagación <i>in vitro</i> de guayabo ..	17
2.8 Mejoramiento genético del guayabo	17

III. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1 Material Genético.....	19
3.1.1 Manejo de las plantas madre.....	19
3.1.2 Genotipos	20
3.2 Acondicionamiento del laboratorio, equipo e instrumental	21
3.3 Propagación <i>in vitro</i> de explantes provenientes de yemas apicales.	22
3.3.1 Colecta.....	22
3.3.2 Lavado	22
3.3.3 Desinfección	22
3.4 Establecimiento o Implantación.	23
3.5 Multiplicación	24
A. Efecto de la concentración de BAP	24
B. Efecto del tiempo de subcultivo	25
3.6 Enraizamiento	26
3.6.1 Efecto de compuestos auxínicos	26
3.7 Análisis estadístico	27
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
V. CONCLUSIONES	45
VI. BIBLIOGRAFÍA	46

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables de respuesta a las concentraciones de BAP en la etapa de multiplicación, 30 días después del inicio de los tratamientos, en los genotipos de guayabo 17-06 y RER.....	28
Cuadro 2. Efecto promedio de la concentración de BAP en la multiplicación <i>in vitro</i> de brotes de guayabo de los genotipos 17-06 y Roja Exterior Redonda (RER), 30 días después de aplicados los tratamientos.....	30
Cuadro 3. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables de respuesta a las concentraciones de BAP en la etapa de multiplicación, a 60 días después de aplicados los tratamientos en los genotipos de guayabo 17-06 y Roja Exterior Redonda.	33
Cuadro 4. Efecto de la concentración de BAP en la multiplicación <i>in vitro</i> de brotes de guayabo de los genotipos 17-06 y Roja Exterior Redonda, a 60 días después de aplicados los tratamientos.	35
Cuadro 5. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables longitud del explante, número de brotes, longitud de brote, coeficiente de multiplicación y número de nudos para los tratamientos subcultivo de 30 y 45 días.	38
Cuadro 6. Efecto promedio del tiempo de subcultivo en la multiplicación <i>in vitro</i> de brotes de guayabo de la selección Roja Exterior Redonda (RER).....	39

Cuadro 7. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables de respuesta a dos reguladores de crecimiento AIA y ANA en la etapa de enraizamiento, 45 días después del inicio de los tratamientos, en el genotipo de guayabo Roja Exterior Redonda. 40

Cuadro 8. Efecto de dos hormonas de tipo auxínico sobre el enraizamiento *in vitro* de guayabo de la selección Roja Exterior Redonda, 45 días después del inicio de los tratamientos..... 41

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Explantes de guayabo selección 17-06 en etapa de multiplicación, 30 días después de iniciados los tratamientos de cuatro concentraciones de BAP.... 31
- Figura 2.** Explantes de guayabo selección RER en etapa de multiplicación, 30 días después de iniciados los tratamientos de cuatro concentraciones de BAP.... 32
- Figura 3.** Explantes de guayabo selección RER en etapa de enraizamiento, utilizando dos distintos reguladores de crecimiento de efecto auxínico, a 45 días de iniciados los tratamientos.. 44

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Comparación de la composición de sales básicas usadas en la preparación de medios de cultivo (Mroginski *et al.*, 2004; Velázquez *et al.*, 2006). 12

I. INTRODUCCIÓN

El guayabo pertenece al orden de los *Myrtales*, el cual está constituido por cinco familias: *Myrtaceae*, *Lecythruidaceae*, *Melastomacetae*, *Cobretaceae* y *Rhizophocaceae*. La familia *Myrtaceae* está representada por aproximadamente 3000 especies de árboles y arbustos (Manica, 2000). De los géneros con mayor importancia económica se citan: *Eugenia*, *Feijoa*, *Myciaria* y *Psidium*; de éstos, *Psidium* es el más conocido y comprende más de 140 especies (Hayes, 1960). En México algunas especies de las más importantes son *P. guajava* L., seguida de *P. sartorianum*, *P. guineense* Swartz, *P. friedrichsthalianum*(Berg.) Nied, *P. salutare*, *P. hypoglaucum*, *P. galapageium*, *P. cattleianum* Sabine, y *P. cattleianum* Lucidum (Mata y Rodríguez, 2000). *P. guajava* L., es la especie de mayor importancia económica para la mayoría de los países tropicales y subtropicales donde se cultiva (Rai *et al.*, 2010). La mayor parte de las especies de guayabo poseen una excelente y amplia adaptación a diversos tipos de suelo y clima, también pueden comportarse como árboles caducifolios o perennifolios, según la disponibilidad de humedad.

La producción de guayaba en México está basada casi exclusivamente en el cultivar 'Media China', tanto para consumo en fresco como fruta procesada, lo cual es un factor que limita fuertemente la producción y la diversificación de los mercados, por lo que es urgente la generación de variedades y selecciones de frutos de diversa coloración de pulpa y de epidermis, destinadas para consumo en fresco e industrial.

En el proceso de diversificación de la guayaba están involucrados varios factores de índole genético, social, económico y tecnológico. Dentro de estos últimos, las técnicas de propagación juegan un papel preponderante. En la mayoría de las plantaciones de guayabo se han utilizado técnicas convencionales de propagación, como la obtención de plantas a partir de hijuelos derivados de raíz, de estacas leñosas y de acodos aéreos (Chandra *et al.*, 2004). Esta forma de propagación convencional está afectando los rendimientos y la sanidad de las plantaciones de guayabo, por la presencia de agentes patógenos y una reducción en la emisión de raíces, a medida que la edad de los árboles avanza (Litz y Jaiswal, 1991; Thorpe *et al.*, 1991). También la propagación

a partir de semillas es una práctica utilizada, dando como resultado una variación en tamaño, forma y calidad de los frutos (Mishra *et al.*, 2007) lo cual dificulta el manejo del cultivo, encarece la cosecha y las prácticas de postcosecha (Ali *et al.*, 2003).

El alcance de los métodos convencionales de mejoramiento genético en el cultivo de guayabo ha sido limitado, debido a los largos periodos de juvenilidad de las plantas en las diferentes generaciones de mejoramiento, a su incompatibilidad en la reproducción y a su naturaleza heterocigótica, por lo que algunos enfoques biotecnológicos como la transformación genética podrían resolver tales limitantes en el mejoramiento del guayabo (Rai *et al.*, 2010).

La regeneración *in vitro* de plantas completas, también conocida como micropropagación o por técnicas biotecnológicas, puede ser una alternativa de propagación o el complemento perfecto de los métodos convencionales, al obtener a gran escala plantas de calidad, uniformes y libres de microorganismos (Pontikis, 1996; Olmos *et al.*, 2004). La técnica de propagación clonal a partir de células o tejidos, posibilita obtener plantas completas y facilita el mejoramiento genético de árboles de importancia económica, en un menor tiempo (Giri *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004). Lo anterior es posible, debido a que las células somáticas de cualquier tejido son capaces de formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo a la estimulación que reciban; fenómeno conocido como totipotencia (Olmos *et al.*, 2004).

En *P. guajava* L. son pocos los trabajos de investigación publicados con relación al uso de la biotecnología. De las pocas investigaciones existentes, la mayoría están dirigidas al desarrollo de protocolos para la propagación *in vitro* de algunos tipos de guayaba y todas ellas, por lo general, utilizan la vía morfogénica de la organogénesis directa; es decir, la obtención de plantas a partir de yemas vegetativas (Jaiswal y Amin, 1987; Amin y Jaiswal, 1987, 1988; Mohamed-Yasseen *et al.*, 1995; León *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 2001; Ali *et al.*, 2003). Sin embargo, los protocolos así generados son específicos para algunas variedades de guayabo y no tienen reproducibilidad en todos los ambientes y condiciones específicas de establecimiento *in vitro* como los niveles de contaminación, síntesis y liberación de fenoles y la capacidad de brotación de los explantes (Concepción *et al.*, 2004). En México, por ser considerado centro de origen,

el guayabo posee una amplia variabilidad genética y los protocolos de propagación *in vitro* reportados deben ajustarse a los tipos de guayabo y a las condiciones ambientales, de ahí la importancia que adquiere la presente investigación.

1.1 Objetivo general

Elaborar un protocolo de propagación *in vitro* utilizando organogénesis directa a partir de yemas vegetativas de dos selecciones de guayabo Roja Exterior Redonda (RER) y 17-06.

1.1.1 Objetivos Particulares

1. Determinar la mejor concentración de Bencil Aminopurina (BAP) durante la fase de multiplicación del cultivo *in vitro* para las selecciones RER y 17-06.
2. Encontrar el mayor coeficiente de multiplicación de dos diferentes selecciones de guayabo, con base en el tiempo de subcultivo.
3. Evaluar el efecto de dos reguladores de crecimiento de carácter auxínico sobre el enraizamiento *in vitro* de ambas selecciones de guayabo.

1.2 Hipótesis

- Por sus características genéticas, cada selección de guayabo tiene diferente comportamiento al ser sometidas a la misma concentración de BAP y a tiempos similares de subcultivo.
- Al aumentar el tiempo de subcultivo se espera un efecto positivo sobre el coeficiente de multiplicación en los dos genotipos de guayabo.
- El uso de reguladores de crecimiento de carácter auxínico favorece la generación de raíces de los explantes de guayabo provenientes de la multiplicación *in vitro* y este efecto es diferente para cada genotipo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen

Determinar el origen del guayabo *Psidium guajava* L. presenta un alto grado de dificultad debido a que existe una gran diversidad fenotípica, tanto en árboles como en frutos (González *et al.*, 2002). Sin embargo, se sabe que es oriundo de la región tropical de América, específicamente entre México y Perú. Estas afirmaciones se sustentan en las más de 140 especies del género *Psidium* que se distribuyen en el trópico americano y solo una pequeña proporción proviene de la India, ya que los árboles de guayabo *Psidium guajava* L., crecen en forma silvestre en el sureste de México, Centroamérica y Perú (Bourke, 1975).

En México, las distintas razas de guayabo reciben diferentes nombres nativos: pichi, chac-pichi (maya, Yucatán), posh (mixe, Oaxaca), enandí (tarasco, Michoacán) y bec (huasteco, San Luis Potosí), entre otros (Pennington y Sarukhán, 1968).

2.2 Clasificación taxonómica y morfología de *Psidium guajava* L.

Según González *et al.* (2002) el guayabo pertenece al Reino Plantae, Subreino Fanerogamae, Subdivisión Lignosae, Clase Angiospermae, Subclase Dicotiledoneae, Orden Myrtaceae, Género *Psidium* y Especie *guajava*.

El guayabo es un árbol o arbusto pequeño (Samson, 1986) que bajo condiciones de alta humedad puede tener una altura de 6 a 9 m, aunque algunos autores como Morton (1987) y Yadava (1996) señalan que es un arbusto de 3 a 10 m de altura. El diámetro del tallo oscila entre 20 a 30 cm o más (Nakasone y Paul, 1998; Morton, 1987). El tronco es torcido y ramificado, con frecuencia presenta gran cantidad de hijuelos de raíz (Nakasone y Paul, 1998). Las hojas son coriáceas, generalmente oblongas o elípticas, pubescentes, dispuestas en pares alternos a lo largo de las ramas. Las flores son hermafroditas, presentan una corola formada por cuatro o cinco pétalos de color blanco. El cáliz en botón es cerrado y tiene de cuatro a cinco sépalos. El

androceo posee numerosos estambres de color blanco cremoso, con anteras ovales y prolíferas en polen. El gineceo presenta un solo pistilo con ovario ínfero. Las flores son solitarias o agrupadas en racimos que brotan de las yemas axilares. El fruto está clasificado como una baya y puede tener diferentes formas desde cilíndrica hasta periforme, con un peso promedio entre 15 y 460 g. El contenido de semillas es variable y en algunos casos sobrepasa el 2 % del peso total del fruto (Cañizares, 1968; Peña *et al.*, 1996).

2.3 Importancia de la Fruticultura en México

La fruticultura en México es una actividad importante, se estima una superficie aproximada de 1.3 millones de hectáreas plantadas con frutales, de las cuales 85 % son perennifolios de clima cálido y semicálido y 15 % caducifolios de clima templado (SIACON, 2008).

Por muchos años la fruticultura del Estado de Zacatecas se ha basado en los cultivos de duraznero (17 592 ha), guayabo (3 955 ha), nopal tunero (16 550 ha), vid (3 696 ha) y manzano (1 301 ha) (SAGARPA, 2008). Por la vasta superficie del Estado y la presencia de algunos microclimas, es factible diversificar aún más la fruticultura, mediante la obtención de nuevas variedades de las especies existentes o con la introducción de nuevas especies de frutales como el olivo, pistache y algunas anonáceas, entre otras.

2.4 Países productores de guayaba y producción en México

Los principales países productores de guayaba en el mundo son: Pakistán, Egipto, México, Bangladesh, Estados Unidos y Brasil.

En 2007 México ocupó el tercer lugar mundial, con una producción de 277 543 toneladas, y una superficie de 22 489 hectáreas cosechadas (SAGARPA, 2008); de las cuales 90 % se concentró en los estados de Michoacán, Aguascalientes y Zacatecas,

con 9 396, 6 643 y 3 955 hectáreas, con rendimientos promedio de 14.02, 11.37 y 9.50 t·ha⁻¹, respectivamente.

La importancia social y económica del cultivo de guayabo en México radica en la gran demanda de mano de obra que requiere, en promedio son 180 jornales/ha/año. La mayoría de las huertas son pequeñas, el promedio de superficie oscila entre 3 y 5 ha, por lo que el número de productores guayaberos es elevado, se estima en más de 7000 productores a nivel nacional (Padilla, 2007).

2.5 Métodos de propagación de guayabo

En muchos países, la mayoría de la producción de guayaba se hace de plantas propagadas por semilla, lo que conlleva una gran heterogeneidad de plantas y frutos debido a la polinización cruzada que se realiza. Sin embargo, en la mayor parte de las regiones productoras de México las plantas han sido propagadas vegetativamente, donde la producción de frutos de primera calidad son muy valoradas para la industria o el consumo en fresco (Manica, 2000).

2.5.1 Propagación sexual

El guayabo se reproduce naturalmente por semilla lo que ha dado origen a través del tiempo a una gran variabilidad en diferentes aspectos como: forma y tamaño de plantas, de frutos y de colores del fruto (Tong *et al.*, 1991; Mishra *et al.*, 2007). Por lo general, las semillas son monoembrónicas y poseen hasta 30 % de cruzamiento, aspecto que las limita como método de propagación clonal masivo (Pontikis, 1996). La propagación a través de semillas es recomendada para la formación de portainjertos vigorosos, porque poseen un sistema radical bien desarrollado y adaptado a diferentes tipos de suelo. También la propagación sexual del guayabo es empleada comúnmente en trabajos de mejoramiento genético, con el objetivo de obtener nuevas selecciones, variedades o cultivares producto de métodos de selección y cruzamiento (Manica, 2000).

2.5.2 Propagación vegetativa de guayabo

La propagación del guayabo vía vegetativa puede ser por injerto, acodo, esquejes de raíz o de ramas y por cultivo de tejidos.

Las modalidades de acodo y estacas de raíz presentan dificultades debido al pequeño número de plantas que se puede obtener de cada progenitor, y es poco remunerable en escala comercial; pero estos métodos se justifican para la obtención de plantas con características especiales como la reproducción de plantas madre de alta calidad (Manica, 2000).

2.5.2.1 Propagación por acodo

Para la propagación por acodo se inicia con la selección de las plantas madre vigorosas, muy productivas, con frutos de buena calidad, con resistencia a plagas y enfermedades y de estructura vegetativa bien equilibrada. Para acelerar o aumentar el enraizamiento o prendimiento del acodo, se aconseja aplicar ácido indolbutírico en concentraciones de 2 000 a 2 500 ppm en lanolina, en la zona de anillado de la rama. En seguida se debe cubrir totalmente la zona de anillado con el sustrato peat moss humedecido y envuelto por un plástico transparente. Transcurridos 20 a 35 días se inicia la emisión de las raíces de la rama donde se realizó el anillado, después de que se aprecian raíces en el exterior del plástico y cuando han transcurrido 40 días después del inicio del tratamiento, debe realizarse la separación gradual de la planta madre, cortando cada tercer día un tercio del diámetro de la rama cubierta con el plástico. Cuando se separa completamente los nuevos individuos se colocan individuos en envases independientes y se le eliminan 60 % a 70 % de las hojas presentes en la rama. Las plántulas deben mantenerse en un lugar con alta humedad relativa, preferentemente en cámaras con nebulización durante 10 a 15 días. Después pueden ponerse bajo una malla sombra con riegos diarios, para que las nuevas ramas se desarrollen hasta alcanzar una altura entre 25 a 30 cm; 30 a 45 días después pueden trasladarse al campo de plantación (Manica, 2000).

2.5.2.2 Cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos se define como el conjunto de técnicas muy heterogéneas que presentan en común el que un explante (parte separada de la planta madre, misma que puede ser una célula, tejido u órgano) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Mroginski *et al.*, 2004). El cultivo de tejidos puede ser una herramienta para el genotecnista de frutales, como el cultivo de embriones, la producción de plantas libres de virus y la producción a gran escala de plantas de clones con características deseables; de igual manera, es un método eficiente para la conservación de germoplasma a bajas temperaturas (Zimmerman, 1988).

2.6 Micropropagación

La micropropagación se refiere a la multiplicación asexual *in vitro*, que permite incrementar rápidamente la obtención de plantas de nuevas selecciones mejoradas, para favorecer que la evaluación en campo (agronómica y de calidad de frutos) se haga en menor tiempo de lo que se requiere al emplear los métodos de propagación convencional (Zimmerman, 1988). También el método de micropropagación podría ayudar a la reproducción rápida y masiva de poblaciones clonales de variedades comerciales de guayaba. Sin embargo, antes de usar esta técnica para el establecimiento de plantaciones con fines de producción, es necesario recopilar información o realizar experimentos sobre los requerimientos de cada variedad que se desea micropropagar, para definir protocolos específicos que mejoren las condiciones de cultivo (Murashige, 1974; Anderson, 1980; Lakshmi *et al.*, 1982; Chandra y Mishra, 2007).

2.6.1 Morfogénesis *in vitro*

Durante el cultivo *in vitro* de especies vegetales hay dos procesos de uso frecuente que son la embriogénesis somática y la organogénesis. El primero es el proceso por el cual se desarrollan estructuras similares a un embrión zigótico, sin que haya de por medio la

fusión de gametos, mientras que la organogénesis es la obtención de tallos, raíces o flores, a partir de una célula o un grupo de células, que tienen la propiedad de mantenerse en activa división mitótica, según las condiciones de cultivo (Radice, 2004).

2.6.1.1 Tipos de morfogénesis

Organogénesis directa. A partir de la siembra *in vitro* de diferentes explantes y en condiciones adecuadas puede inducirse la formación de nuevos brotes, raíces o flores de manera directa; es decir, sin la formación previa de callo (Radice, 2004). Este proceso puede ocurrir a partir de estructuras preexistentes en los explantes como son las yemas (Andreu y Marín, 2005).

Organogénesis indirecta. A partir de la siembra de un explante *in vitro* se presenta la proliferación de células en forma desordenada y sin ninguna función predeterminada, lo que da lugar a la producción de callos o suspensiones celulares. La diferenciación de órganos a partir de callos o morfogénesis indirecta, está condicionada a la previa formación de los meristemoides, que son conjuntos de células en forma de esferas que contienen citoplasmas densos y grandes nucléolos. Estos meristemoides son los responsables de la diferenciación de los nuevos órganos. Este tipo de meristemo puede iniciarse en forma directa a partir de células diferenciadas, pertenecientes a un explante cultivado *in vitro* o, indirectamente, a partir de una célula o grupo de células diferenciadas que promueven la proliferación celular (Radice, 2004).

2.6.2 Factores que afectan los procesos morfogénicos

De acuerdo con Radice (2004) existen diferentes factores que afectan los procesos morfogénicos durante el cultivo *in vitro*, pero son cuatro los que principalmente explican los resultados de esta técnica de propagación:

1. El Genotipo
2. El explante
3. Las condiciones químicas para realizar el cultivo
4. Las condiciones físicas para realizar el cultivo

2.6.2.1 El Genotipo

El genotipo es un factor determinante pues define el potencial del explante para su establecimiento en cultivo *in vitro*, su capacidad de diferenciación y el crecimiento de nuevos órganos. Por lo que no es posible generalizar protocolos de trabajo, ya que éstos deben ser específicos para cada genotipo.

2.6.2.2 Tipo de Explantes

Por explante se puede definir a cualquier parte separada de la planta, pueden ser protoplastos, células, tejidos u órganos, que se cultivan asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuban en condiciones ambientales controladas (Mroginski *et al.*, 2004).

El manejo de la planta madre, las condiciones físicas y fisiológicas en las que ella se encuentre y la posición de dónde se tome el explante, determinan la respuesta morfogénica de éste en condiciones *in vitro* (Radice, 2004).

El estado fisiológico de la planta influye significativamente en la capacidad morfogénica del explante. Por ejemplo, se ha encontrado que los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas de diferentes edades fisiológicas (Styer *et al.*, 1983); mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mayor será la respuesta *in vitro* (Villalobos *et al.*, 1982).

Lo posición relativa de las yemas en la planta es otro factor importante. En rosal las yemas axilares obtenidas de la parte media del tallo se desarrollan más rápidamente que aquéllas obtenidas de la base o de la porción apical (Bressan *et al.*, 1982).

2.6.2.3 Condiciones químicas

En la propagación *in vitro* son diversos los compuestos químicos que se emplean y que tienen efectos sobre el comportamiento de los explantes, dentro de los cuales se consideran los siguientes:

Sales: Se han propuesto diferentes composiciones salinas, algunas son específicas para cada especie, aunque otras se han generalizado como sales base para el medio de cultivo (Tabla 1) algunas son las propuestas por Lloyd y McCown (1981) (WPM) y Driver y Kuniyuki (1984) (DKW). En forma general, la composición salina más difundida y que mayormente es utilizada es la propuesta por Murashige y Skoog (MS) (1962). Uribe y Cifuentes (2004) reportan que al comparar las composiciones salinas DKW y MS, estas últimas fueron en donde los explantes de *Legrandia concinna* presentaron mayor supervivencia, probablemente por la mayor concentración de algunos elementos como el nitrógeno y el potasio, que tienen una acción estimulante sobre la formación de las yemas.

Reguladores de crecimiento: los reguladores de crecimiento son compuestos que promueven la morfogénesis. En el cultivo *in vitro* las hormonas más utilizadas son las citocininas y las auxinas, y aunque es muy importante la aplicación de reguladores de crecimiento se debe tener un adecuado manejo de éstos ya que debe existir un balance, debido a que cada regulador de crecimiento tiene una función independiente pero que pueden interactuar, tal como lo menciona Barceló *et al.* (1995). Así, al aumentar la cantidad de citocinina con respecto a la auxina, se induce la formación de brotes que, en condiciones óptimas de cultivo, se puede incrementar significativamente la diferenciación de órganos. Por otro lado, Vieitez y Vieitez (1980) señalan que cuando los explantes de castaño (*Castanea sativa* Mill.) se someten a medios de cultivo deficientes en bencil aminopurina la multiplicación de los brotes es casi nula; mientras que Pierik (1990) señala que se tiene que tomar en consideración el contenido endógeno de hormonas en cada especie para definir la concentración que se debe aplicar al medio de cultivo ya que de acuerdo al contenido endógeno varía el tipo y concentración que se va a emplear.

Tabla 1. Comparación de la composición de sales básicas usadas en la preparación de medios de cultivo (Mroginski *et al.*, 2004; Velázquez *et al.*, 2006).

Sales básicas	MS	DKW	WPM
Macronutrientes (mg·L ⁻¹)			
KNO ₃	1900	--	--
NH ₄ NO ₃	1650	1416	400
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	--	1969	556
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	149	96
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	740	370
K ₂ SO ₄	--	1559	---
KH ₂ PO ₄	170	265	170
Micronutrientes (mg·L ⁻¹)			
KI	0.83	--	--
H ₃ BO ₃	0.62	0.48	6.2
MnSO ₄ ·7H ₂ O	155	--	29.43
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.86	--	8.6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.39	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.025	0.25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	--	--
Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	--	17000	--
MnSO ₄ ·H ₂ O	--	33400	--
CaCl ₂	3	--	--
Ca(NO ₃) ₂	3	--	--
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2780	33800	27.8
NA ₂ - EDTA	3730	45000	37.3

2.6.2.3.1 Auxinas

Son hormonas de crecimiento que se producen principalmente en las partes jóvenes de la planta: ápices, frutos tiernos y hojas en desarrollo. Las auxinas estimulan el crecimiento mediante el alargamiento de los tallos por división celular y participan en la formación de curvaturas fototrópicas (hacia la fuente de luz), gravitrópicas (de acuerdo al vector de gravedad en la raíz). Participan en la inhibición correlativa de las yemas axilares y brotes, por efecto del ápice del brote principal. Mientras una planta crezca, significa que hay síntesis y acción de las auxinas. Cuando el crecimiento disminuye o se detiene se considera que la síntesis de auxinas se ha reducido o que éstas pudieron ser degradadas, o que no hay suficientes “receptores” de auxinas para canalizar las reacciones químicas (Díaz, 2002).

En las plantas el transporte de auxinas es basípeto; este tipo de transporte es muy importante para el papel que desarrollan las auxinas en las plantas ya que al inhibirse el transporte basípeto en los ápices cultivados *in vitro*, éstos no generan primordios foliares y se desarrollan tallos sin hojas. La aplicación de auxinas al tallo restablece la formación de los primordios foliares.

2.6.2.3.2 Citocininas

La función más importante de las citocininas es la estimulación de la división celular en plantas, lo que favorece el crecimiento y el retraso del envejecimiento de los tejidos. Tienen efectos sobre procesos fisiológicos importantes ya que acortan el periodo de latencia de las yemas. Son también un factor muy activo en la regulación de la morfogénesis ya que suprimen la dominancia apical en las plantas, lo que estimula la brotación de yemas laterales. Este fenómeno de estimulación del crecimiento de yemas axilares es muy utilizado en la técnica de micropropagación (Borkowska y Jankiewicz, 2003).

En el cultivo de tejidos se puede regular el desarrollo del explante mediante la adición de citocininas en el medio de cultivo, dado que se regula el número de divisiones celulares y el desarrollo de las yemas.

2.6.2.4 Condiciones físicas

Las condiciones físicas que tienen mayor efecto sobre los procesos morfogénicos de la propagación *in vitro* son la radiación y la temperatura. Durante el cultivo *in vitro* la temperatura se mantiene estable para favorecer el crecimiento del explante. De tal modo que es de suma importancia mantener la temperatura óptima de crecimiento, la que se determina de acuerdo a la especie. Para la radiación suministrada se debe tomar en cuenta su calidad, su intensidad y el periodo de suministro, ya que con base en el tiempo de exposición de los explantes influye la diferenciación de los órganos, además de jugar un papel importante en la acción de los reguladores de crecimiento (Villalobos *et al.*, 1984; Radice, 2004)

2.7 Micropropagación de guayabo

El guayabo es un importante cultivo tropical que es propagado por semillas, acodos, estacas e injertos; sin embargo, estos métodos de multiplicación no son lo suficientemente rápidos, además de que la cantidad de material que se obtiene es relativamente baja (Mishra *et al.*, 2007; Singh, 1986). Otras desventajas que se presentan son: la propagación por semillas puede generar hasta 30 % de variación; en la multiplicación por estacas y acodos la exudación de fenoles disminuye la emisión de raíces; la reproducción por injertos favorece la dispersión de enfermedades, además de ser altamente afectada por la contaminación ambiental (Concepción *et al.*, 2004) por lo que la micropropagación puede ser un método que asista la rápida producción en masa de clones de cultivares de guayabo de interés comercial o en proceso de mejoramiento genético (Mishra *et al.*, 2007).

Aunque la micropropagación *in vitro* de especies leñosas, particularmente de la guayaba es considerado un método muy eficaz para multiplicar clones de materiales élite, se presentan problemas que impiden el empleo de esta técnica como son la lixiviación de fenoles, la contaminación y la regeneración de los explantes. Por lo anterior, se han evaluado diferentes técnicas que han disminuido el impacto de estas limitaciones (Chandra y Mishra, 2007).

En guayabo (Amin y Jaiswal, 1988; Papadatou *et al.*, 1990; Mohamed-Yassen *et al.*, 1995, Pérez *et al.*, 2002), al igual que en muchas otras especies de la familia Myrtaceae (Toussaint *et al.*, 1992; List *et al.*, 1996; Oltramari *et al.*, 2000), se han podido utilizar convenientemente las técnicas de propagación *in vitro* y se ha demostrado que tienen mayores ventajas que los métodos convencionales de propagación.

2.7.1 Factores que afectan la micropropagación de guayabo

En la propagación *in vitro* del guayabo a partir de yemas se presentan dos problemas que determinan el éxito o fracaso de esta metodología que son: la contaminación por agentes patógenos y la producción de fenoles que se liberan al medio, que provocan taponamiento de los tejidos del explante y evita el transporte de nutrimentos. Estos problemas se acentúan si el material que se va a sembrar proviene directamente de campo (Ramírez *et al.*, 1999; Concepción *et al.*, 2004).

La fuente de contaminación en el cultivo *in vitro* de guayaba son los hongos y bacterias (Ramírez *et al.*, 1999). Existen diversos factores que favorecen su proliferación, el principal es cuando las plantas madre crecen directamente en campo, ya que están expuestas a enfermedades, plagas y polvo; otro factor desfavorable es la propia morfología de los explantes ya que poseen tricomas tanto en las hojas como en el tallo, lo que dificulta la penetración de los agentes desinfectantes (Baker *et al.*, 1979).

El oscurecimiento de los tejidos causado por la producción de fenoles está relacionada con el estado fisiológico de la planta, tal como lo menciona George (1993) ya que se vincula con la presencia y acumulación de fenoles en ésta. El uso de material vegetal en estado juvenil, ya sea de plántulas o de árboles maduros, es un factor importante que debe ser considerado en el establecimiento *in vitro*.

La síntesis y exudación de fenoles se puede controlar con el uso de diferentes antioxidantes, para cambiar el potencial redox del medio de cultivo, también manteniendo las plantas madre o algunas de sus ramas en oscuridad hasta que los brotes muestren etiolación. El etiolado parcial de explantes de diferentes cultivares de

guayabo aumenta significativamente la supervivencia del explante (Chandra y Mishra, 2007).

Mantener los explantes de guayabo en polyvinylpyrrolidone 0.5 % durante su colecta y realizar dos a tres subcultivos del medio de cultivo durante los primeros 10 a 15 días después de la siembra, son esenciales para el buen establecimiento de los explantes, ya que se evita el taponamiento de los tejidos causado por la producción de fenoles.

La regeneración *in vitro* de ápices y segmentos nodales (nudo con yemas axilares) de árboles maduros de guayaba fue descrita por Amin y Jaiswal (1987) y Loh y Rao (1989).

2.7.2 Efecto de las hormonas en el cultivo *in vitro* de guayabo

El contenido endógeno de hormonas en la planta es un elemento muy importante para definir el tipo de reguladores de crecimiento que se van a utilizar en la micropropagación de guayabo. Pérez *et al.* (2002) mencionan que la citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) tiene mayor respuesta comparada con otras hormonas como Thidiazuron (TDZ), 6-Furfurilaminopurina (Kin) y 2-Isopentiladenina (2iP), ya que BAP promueve un mayor número de brotes y son de mayor longitud, lo que se traduce en un mayor coeficiente de multiplicación (número de explantes que se obtienen a partir de un explante inicial, luego de cierto periodo de subcultivo).

Como se mencionó, la citocinina BAP presenta los mejores resultados en la multiplicación *in vitro* de guayabo; sin embargo, la concentración del regulador de crecimiento que se va a aplicar es otra variable que se debe tomar en cuenta. La concentración a utilizar depende del cultivar que se está manejando; Pérez *et al.* (2002) señalan que cuando se aplica BAP 0.5 mgL^{-1} en la variedad Enana Roja Cubana EEA 18-40 se obtiene el mayor número de brotes y el coeficiente de multiplicación más alto. Por otro lado, Zamir *et al.* (2007) encontraron que para el Cv. Safeda hay una mayor generación de brotes cuando se añade 1.0 mgL^{-1} de la hormona BAP al medio de cultivo, y que la generación de brotes disminuye al reducir la concentración. Mishra *et al.* (2007) reportan para el Cv. Allahabad, que al aplicar 2.0 mgL^{-1} de BAP en el medio

de cultivo se obtienen brotes de mayor longitud (7.3 mm), mientras que al añadir 3.0 mgL⁻¹ de esta hormona se obtiene mayor número de brotes (2.67 brotes) pero de menor tamaño, resultados que concuerdan con los obtenidos por Ali *et al.* (2003) que obtuvieron un mayor número de brotes al utilizar BAP 2.0 mgL⁻¹ en el medio de cultivo.

En el caso de las auxinas, varios autores recomiendan la adición de AIA, 0.1-0.5 mgL⁻¹, porque permite la formación de brotes de mayor calidad (Jaiswal y Amin, 1987).

2.7.3 Influencia del periodo de subcultivo en la propagación *in vitro* de guayabo

Pérez *et al.* (2002) señalan que el número de entrenudos de los explantes aumenta conforme el periodo de subcultivo aumenta, al igual que el coeficiente de multiplicación; este aspecto está determinado por el crecimiento de los explantes, ya que la citocinina se agota y hace que el efecto inhibitorio de la dominancia apical desaparezca, incrementándose de esta manera el número de entrenudos. Sin embargo, al ser más largo el periodo de subcultivo y los reguladores de crecimiento aplicados al medio de cultivo se agotan, provoca que los entrenudos sean más cortos y dificulten su separación.

2.8 Mejoramiento genético del guayabo

La prioridad para iniciar cualquier programa de mejoramiento de los cultivos de guayabo debe estar basado en frutos de buena calidad, altos rendimientos, resistencia a enfermedades, aumentar la vida de anaquel, alto contenido de vitamina C y pectinas, color de pulpa y semillas blandas (Dinesh y Iyer, 2005).

La variabilidad morfológica y bioquímica en guayabo es notable entre y dentro de huertas productoras de México, pero se desconoce su diversidad genética, la cual servirá para su mejoramiento genético. En México no existen variedades mejoradas que se cultiven extensamente y que además presenten ventajas agronómicas que permitan la homogenización de las huertas (Martínez *et al.*, 2004). Por otra parte, las variaciones del germoplasma pueden ser aprovechadas mediante la selección y evaluación de material que presente ventajas comparativas, las cuales, una vez

caracterizadas, pueden ser registradas y liberadas como variedades clonales (Padilla *et al.*, 2010).

El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) desde la década de los 80s, mediante exploración de la zona productora de Calvillo-Cañones seleccionó clones sobresalientes, generando cinco nuevas variedades de guayabo con características agronómicas distintivas, como el tamaño del fruto, el color de la pulpa y contenido de azúcares (°Brix). Las variedades liberadas son: Calvillo Siglo XXI, Huejucar, HidroZac, Caxcana y Merita. Las cinco variedades fueron obtenidas por el método de selección individual en huertas comerciales de la región Calvillo-Cañones (Padilla *et al.*, 2010).

El mejoramiento genético de la guayaba, auxiliado de técnicas biotecnológicas, se ha basado en la micropropagación a partir de secciones de plántulas provenientes de semilla botánica, de materiales con alto rendimiento, con la finalidad de clonar cada uno de los individuos provenientes de semilla, constituyendo así líneas de plantas *in vitro* genéticamente uniformes, que posiblemente sean promisorias (Collado *et al.*, 2005).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Usos Múltiples perteneciente al Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, en coordinación con el Laboratorio del Centro Estatal de Propagación Vegetal del Estado de Zacatecas ubicado en el km 5 de la carretera Jerez – Santa Rita y con el apoyo del programa de Recursos Genéticos y Productividad - Genética del Colegio de Postgraduados.

El protocolo utilizado como base en la fase experimental fue el propuesto para la Variedad Enana Roja Cubana EEA 18-40 (Concepción, 2007).

3.1 Material Genético

3.1.1 Manejo de las plantas madre

Los explantes iniciales para el cultivo *in vitro* de ambos genotipos se obtuvieron de 5 plantas élite o plantas madre de dos años de edad, las cuales se mantuvieron bajo condiciones de invernadero y con malla sombra que redujo 70 % la intensidad luminosa. Las plantas se sometieron a defoliación total para inducir brotes juveniles, los cuales se colectaron y constituyeron los explantes. Después de la recolección de explantes se hizo una nueva defoliación parcial para inducir nuevos brotes. Para obtener los explantes requeridos en el experimento se hicieron siete defoliaciones parciales, y en consecuencia, siete colectas de explantes. Otra medida para ayudar a la brotación vigorosa fue mantener las plantas en condiciones óptimas de fertilidad, humedad y temperatura.

Para mejorar la sanidad de las plantas madre y disminuir una posible contaminación durante el establecimiento *in vitro*, se les aplicó Curamicin 500[®] y Bactrimicin 100[®].

3.1.2 Genotipos

Se consideraron dos genotipos: la selección Roja Exterior Redonda y la selección 17-06, los parámetros para su selección fueron tamaño, forma de la hoja, tamaño y forma del fruto, color y grosor de la pulpa, así como la sanidad de la planta.

Selección 17-06

Este genotipo fue colectado en el año 2005 por el DR. José Luis Domínguez Álvarez y la MC. Esmeralda Cázares Sánchez en el municipio de Vicente Guerrero, Campeche, en donde predomina una vegetación del tipo selva baja caducifolia. Se caracteriza por ser de fruto grande, periforme, con buena firmeza y contenido alto de pulpa color crema. La vegetación predominante se clasifica como selva baja caducifolia. Se colectaron tres frutos de un solo árbol ubicado en un solar de traspatio, las semillas de los tres frutos se mezclaron y se pusieron a germinar en arena sílica bajo condiciones de invernadero, las plántulas se trasplantaron a bolsas de poliuretano para su desarrollo, cuando alcanzaron una altura entre 30 a 40 cm se establecieron en una huerta de prueba en el Municipio de Tabasco, Zacatecas, para evaluar distintas características agronómicas como el tamaño y forma del fruto, así como el rendimiento. Aunque sus rendimientos son similares a la Var. Media China, entre 10 a 14 ton·ha⁻¹, la selección 17-06 posee frutos de gran tamaño 230 g y con un grosor de pulpa de 15 mm, por lo que la hace una selección con gran potencial comercial.

Selección Roja Exterior Redonda

Material colectado en la comunidad de Cerro Colorado, Municipio de Juárez, Michoacán, en donde la vegetación predominante se clasifica como bosque tropical caducifolio. Este genotipo se caracteriza por tener frutos periformes y de coloración rojiza en la epidermis (chapeado). Se colectó un fruto de tres árboles dentro de una huerta comercial; las semillas se mezclaron y se pusieron a germinar en macetas utilizando arena sílica como sustrato dentro de un invernadero. De igual manera este

material fue evaluado en el municipio de Tabasco, Zacatecas; bajo las mismas condiciones que el genotipo 17-06. Aunque sus frutos son de un tamaño medio por debajo de los 230 g, llega a tener rendimientos entre 20 a 30 ton·ha⁻¹ además los frutos tienen un alto contenido de °Brix y la presencia de antocianinas en el fruto hace que sea un genotipo con un potencial comercial alto.

3.2 Acondicionamiento del laboratorio, equipo e instrumental

El acondicionamiento del laboratorio de biotecnología consistió en la previa desinfección de las diferentes áreas de trabajo, como la cámara de incubación, el área de subcultivo y el área de preparación de medios de cultivo. Se usó una solución de fenol a una concentración de 2 % y una mezcla de permanganato de potasio y formaldehído. Los demás espacios del laboratorio como la sala de esterilización y el área de tránsito, fueron desinfectados con una solución al 2 % de cloro comercial.

Los materiales utilizados para el desarrollo del trabajo en sus diferentes etapas incluyeron instrumental quirúrgico, frascos, cajas *petri* y placas para corte, los cuales fueron esterilizados en autoclave durante 30 minutos a una presión de 1.0 kg·cm⁻² y 110 °C.

Las operaciones de inoculación y transferencia de los explantes en los medios de cultivo se realizaron en una cabina de flujo laminar horizontal. La asepsia del instrumental se realizó mediante inmersión en etanol 70 % (v/v) y flameo con mechero de alcohol.

Los cultivos *in vitro* se desarrollaron en el cuarto de incubación, en condiciones de luz artificial proporcionado por lámparas fluorescentes, un fotoperiodo de 16 horas y manteniendo una temperatura de 25 ± 2 °C.

3.3 Propagación *in vitro* de explantes provenientes de yemas apicales

3.3.1 Colecta

La colecta del material vegetal se llevó a cabo durante las mañanas, para evitar que los explantes tuvieran una concentración alta de fenoles debido a que conforme la temperatura y la intensidad luminosa aumentan se favorece su síntesis, ya que el contenido y naturaleza de los fenoles en la planta pueden afectar su crecimiento, pues se modifica el contenido endógeno del ácido 3-indolacético (AIA) (Piñol *et al.*, 2000). Se colectaron todos los ápices presentes en cada planta, con menos de un par de hojas abiertas y con una longitud aproximada de 20 mm en cada genotipo, se usaron tijeras para evitar en lo posible el daño físico del material; para su traslado al laboratorio se colocaron en frascos con $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de una solución antioxidante de polivinilpirrolidone (PVPP) esterilizado previamente en autoclave durante 30 minutos a una presión de $1.0 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ y $110 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.3.2 Lavado

A cada ápice se le eliminaron las hojas presentes cortándolas por la base del pecíolo; esto para eliminar la superficie de contacto que pudiera estar contaminada con algún patógeno. Después, los explantes de cada genotipo se colocaron en frascos individuales para ser lavados con detergente biodegradable (Roma[®]) durante 10 minutos, luego se enjuagaron en agua corriente. Finalmente estos explantes se colocaron ahora en frascos con solución antioxidante PVPP.

3.3.3 Desinfección

La desinfección de los explantes se realizó con una solución de hipoclorito de calcio 3.0 % (m/v) durante 15 minutos, a la que se le agregaron tres gotas de Tween 80, en sustitución del bicloruro de mercurio propuesto para desinfectar por Concepción (2007). El tiempo de 15 minutos y la concentración de hipoclorito de calcio de 3.0 % utilizados fueron definidos en experimentos previos al obtener la supervivencia de 80 % de los explantes. Después de la desinfección se realizaron cuatro enjuagues con una solución

antioxidante estéril de PVPP $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, para eliminar el agente desinfectante e inmediatamente proceder a su establecimiento.

La propagación *in vitro* o micropropagación está dividida en cinco etapas que son: La preparación de las plantas madre, el establecimiento, la multiplicación, el enraizamiento y la aclimatación.

3.4 Establecimiento o Implantación.

Dentro de una cabina de flujo laminar se realizó la siembra de los explantes; a cada explante se le eliminó la parte basal del tallo (para entonces ya necrosada) y se descubrieron las pequeñas yemas eliminando las hojas restantes, para después ser colocados individualmente en tubos de ensaye con 10 mL de medio semisólido de establecimiento. Este medio estuvo constituido por sales del medio basal MS suplementadas con sacarosa 3.0 % (m/v), mio-inositol $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, tiamina·HCl $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, AIA $2.85 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, BAP $4.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y PVPP $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, previamente esterilizado en autoclave durante 15 minutos bajo una presión de $1.0 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ y $110 \text{ }^\circ\text{C}$. Los tubos de ensaye con los explantes sembrados se incubaron en la cámara de crecimiento con las condiciones de luz artificial y temperatura descritas con anterioridad. Esta etapa tuvo una duración de 60 días.

A los 10 días después de iniciado el cultivo *in vitro* se evaluaron las pérdidas por oxidación fenólica y por contaminación, los explantes viables y libres de contaminantes se subcultivaron; es decir, se pasaron a nuevo medio de cultivo de establecimiento. En total, los explantes se subcultivaron tres veces durante el establecimiento, para evitar la presencia de exudados fenólicos que limitaran el aprovechamiento de los nutrimentos del medio de cultivo.

3.5 Multiplicación

A. Efecto de la concentración de BAP

Para evaluar el efecto del BAP (Bencil aminopurina) sobre la multiplicación *in vitro* de los dos genotipos de guayabo y determinar la concentración en donde la respuesta fuera mejor, se llevó a cabo el siguiente experimento.

Se utilizaron explantes (brotes provenientes de la etapa de establecimiento de aproximadamente 10 mm de longitud, con tres nudos visibles) morfológicamente viables y libres de agentes patógenos.

Con el fin de aumentar el material vegetal, los explantes fueron transferidos a frascos de cultivo que contenían 25 mL de medio semisólido de multiplicación, constituido por sales del medio basal MS suplementadas con sacarosa 3.0 % (m/v), mio-inositol 100 mg·L⁻¹, tiamina·HCl 1.0 mg·L⁻¹, BAP 2.2 μmol·L⁻¹ y utilizando Agar como agente gelificante. El medio fue esterilizado previamente en autoclave durante 20 minutos. A los 30 días se realizó un subcultivo de los nuevos brotes emitidos, pasándolos a nuevo medio de multiplicación. La operación se repitió un mes después; es decir, se realizaron dos subcultivos durante esta etapa.

Pasados dos meses de que se transfirieran los brotes a medio de multiplicación, éstos se homogeneizaron a un tamaño aproximado de 10 mm y tres nudos visibles, los cuales se transfirieron a 20 frascos para el caso del genotipo RER y 8 frascos para el genotipo 17-06, con medio de cultivo con 25 mL pero aplicando variantes en el medio semisólido de multiplicación estéril, para probar cuatro concentraciones de BAP: 0.0, 2.2, 4.4 y 6.6 μmol·L⁻¹.

Se colocaron tres brotes por frasco con cinco repeticiones de cada tratamiento en el caso del genotipo RER, y dos repeticiones en el genotipo 17-06. Todos los frascos se mantuvieron en las condiciones de luz artificial y temperatura descritas anteriormente. El diseño experimental utilizado fue Completamente al Azar, tomando como unidad experimental un frasco con tres brotes.

Variables a evaluar

A los 30 días de iniciados los tratamientos, se registró la longitud del explante inicial, el número de brotes emitidos, la longitud del explante inicial, la longitud del brote, el número de raíces, el número de nudos del explante inicial y el coeficiente de multiplicación (CoM) a través de la ecuación:

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

B. Efecto del tiempo de subcultivo

Esta fase se realizó con el objetivo de evaluar la capacidad de multiplicación de los brotes de guayabo al mantenerlos en diferentes tiempos de subcultivo.

El experimento se realizó solo con el genotipo RER, debido a la escasez de material vegetal del genotipo 17-06. Se utilizaron brotes del genotipo RER provenientes de la etapa de multiplicación *in vitro*, que fueron colocados en frascos de cultivo con 25 mL de medio semisólido de multiplicación estéril constituido de acuerdo al mejor resultado obtenido en la fase de multiplicación que fue el tratamiento que contenía la concentración de BAP de $2.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Se colocaron 4 explantes por frasco y se utilizaron 20 frascos de cultivo, 10 para cada tiempo de subcultivo, obteniendo un total de 80 explantes. Los frascos fueron colocados en la cámara de incubación en las condiciones de luz artificial y temperatura antes mencionadas. Los tiempos de subcultivo fueron de 30 y 45 días.

El diseño experimental utilizado fue Completamente al Azar, tomando como unidad experimental un frasco con cuatro brotes.

Variables medidas

Se evaluó la longitud del explante, el número de brotes por explante, la longitud de los brotes y además se estimó el coeficiente de multiplicación CoM, con la ecuación descrita en el experimento anterior.

3.6 Enraizamiento

3.6.1 Efecto de compuestos auxínicos

Se evaluó la respuesta del enraizamiento de explantes de guayabo del genotipo RER que fueron expuestos a medios de cultivo con distintos reguladores del crecimiento de carácter auxínico. Se utilizaron 48 brotes provenientes de la fase de multiplicación *in vitro* los cuales se individualizaron y se seleccionaron los de una longitud aproximada de 10 mm y tres nudos visibles. Se colocaron en frascos de cultivo que contenían 25 mL de medio semisólido de enraizamiento que estuvo constituido por sales del medio basal MS adicionadas con sacarosa 3 % (m/v), mio-inositol $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, tiamina·HCl $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, y los reguladores del crecimiento de carácter auxínico AIA $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Al tratamiento 1 no se le añadió ningún regulador del crecimiento, al tratamiento 2 se le añadió AIA, al tratamiento 3 se le agregó ANA y al tratamiento 4 se le agregaron ambos reguladores de crecimiento en las mismas concentraciones de los tratamientos 2 y 3. Se colocaron tres brotes por cada frasco, para dar un total de cuatro tratamientos con cuatro repeticiones cada uno.

Los frascos se colocaron en la cámara de incubación bajo las condiciones de luz artificial y temperatura ya descritas.

Variables medidas

Después de 30 días de aplicados los tratamientos se evaluó la longitud del explante, el número de raíces, la longitud de raíz, el número de nudos del explante y el número de brotes. El arreglo experimental que se utilizó fue un diseño Completamente al Azar.

3.7 Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos de los experimentos donde se evaluó la concentración de BAP y el tiempo de subcultivo en la etapa de multiplicación y el efecto de reguladores auxínicos en la etapa de enraizamiento, se aplicaron las pruebas estadísticas de Kolmogorov-Smirnov y el Test Levene, para comprobar los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas, respectivamente. Para desarrollar estos procedimientos se utilizó el paquete estadístico *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, 2002) versión 17.0 para Windows (Copyright[©] SPSS Inc., 1998-2002). Al no cumplirse los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, se aplicó la transformación de datos por medio de 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 aplicó análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples DHS de Tukey, con el paquete estadístico SAS versión 9.2.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa de multiplicación

A. Efecto de la concentración de BAP

En el Cuadro 1 se presentan los resultados del análisis de varianza del efecto de los tratamientos de concentración de BAP en la fase de multiplicación de los genotipos de guayabo 17-06 y RER. Hubo diferencias significativas entre genotipos solo para la variable longitud del explante inicial. Para el factor concentración de BAP hubo diferencias altamente significativas para las variables longitud del explante inicial y número de raíces. En el caso de la interacción entre ambos factores no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables estudiadas.

Cuadro 1. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables de respuesta a las concentraciones de BAP en la etapa de multiplicación, 30 días después del inicio de los tratamientos, en los genotipos de guayabo 17-06 y RER.

F.V.	G.L.	NB	LBI	LBM	CoM	NR	NN
Genotipos	1	0.114 ns	0.104 **	0.012 ns	0.107 ns	0.019 ns	0.039 ns
[BAP]	3	0.116 ns	0.022 **	0.008 ns	0.017 ns	0.285 **	0.021 ns
Gen*[BAP]	3	0.070 ns	0.004 ns	0.005 ns	0.003 ns	0.019 ns	0.008 ns
Error	8	0.035	0.002	0.003	0.033	0.020	0.011
Total	15						

Gen= genotipos; [BAP]= Concentración de Bencilamino purina; ** Altamente significativo con $\alpha \leq 0.01$, *Significativo con $\alpha \leq 0.05$ y ns= no significativo. F.V. Fuentes de variación; G.L.=Grados de libertad. Variables: NB= Número de brotes; LBI= Longitud del explante inicial; LBM= Longitud promedio del brote; CoM= Coeficiente de multiplicación; NR= Número de Raíces; NN= Número de nudos.

En general se observa en el Cuadro 2 que el genotipo RER tuvo una mayor respuesta a la variación de la concentración de BAP en la etapa de multiplicación. El genotipo 17-06 respondió favorablemente a la concentración de $2.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ya que a esta concentración el número y la longitud de los brotes fueron mayores en 46 y 15 % respectivamente, comparados con el testigo (sin BAP), de igual manera pasó con el coeficiente de multiplicación. No se encontraron diferencias significativas con los demás tratamientos. Para el genotipo RER se tuvo la mejor respuesta a la concentración de $4.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ donde las variables NB, LBM y CoM tuvieron los mayores valores promedio, aunque estadísticamente fueron similares todos los tratamientos. Al desarrollarse los explantes de ambos genotipos en medios donde no se añadió BAP los explantes iniciales aumentaron significativamente su longitud (LBI), como se muestra en las Figuras 1 y 2; este efecto fue más marcado en el genotipo RER en donde se tuvo la máxima longitud, con respecto al genotipo 17-06 (82 %), para el cual no hubo diferencias significativas entre las distintas concentraciones de BAP. La ausencia de BAP promovió la emisión de raíces en ambos genotipos, encontrando diferencias significativas entre tratamientos y no entre genotipos.

Cuadro 2. Efecto promedio de la concentración de BAP en la multiplicación *in vitro* de brotes de guayaba de los genotipos 17-06 y Roja Exterior Redonda (RER), 30 días después de aplicados los tratamientos.

Tratamiento ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	NB	LBI (mm)	LBM (mm)	CoM	NR	NN
17-06 + 0.0	1.00 a ^z	167 bc	100 a	1.62 a	1.39 ab	2.07 a
17-06 + 2.2	1.46 a	155 c	115 a	1.62 a	1.00 b	1.95 a
17-06 + 4.4	1.14 a	161 bc	103 a	1.58 a	1.00 b	2.16 a
17-06 + 6.6	1.22 a	156 c	103 a	1.47 a	1.00 b	2.03 a
Promedio	1.20	160	105	1.57	1.09	2.05
RER + 0.0	1.15 a	189 a	104 a	1.75 a	1.67 a	2.25 a
RER + 2.2	1.41 a	176 ab	110 a	1.73 a	1.00 b	2.14 a
RER + 4.4	1.69 a	173 abc	117 a	1.82 a	1.00 b	2.19 a
RER + 6.6	1.24 a	165 bc	111 a	1.65 a	1.00 b	2.04 a
Promedio	1.37	175	110	1.73	1.16	2.15
DMS	0.74	18	22	0.71	0.55	0.43
C.V.	14.51	2.76	5.31	10.96	12.47	5.17

NB: Número de brotes; LBI: Longitud del explante inicial; LBM: Longitud de brote; CoM: Coeficiente de multiplicación; NR: Número de raíces; NN: Número de nudos. ^zMedias con la misma letra en el sentido de columnas son iguales, de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P\leq 0.05$.

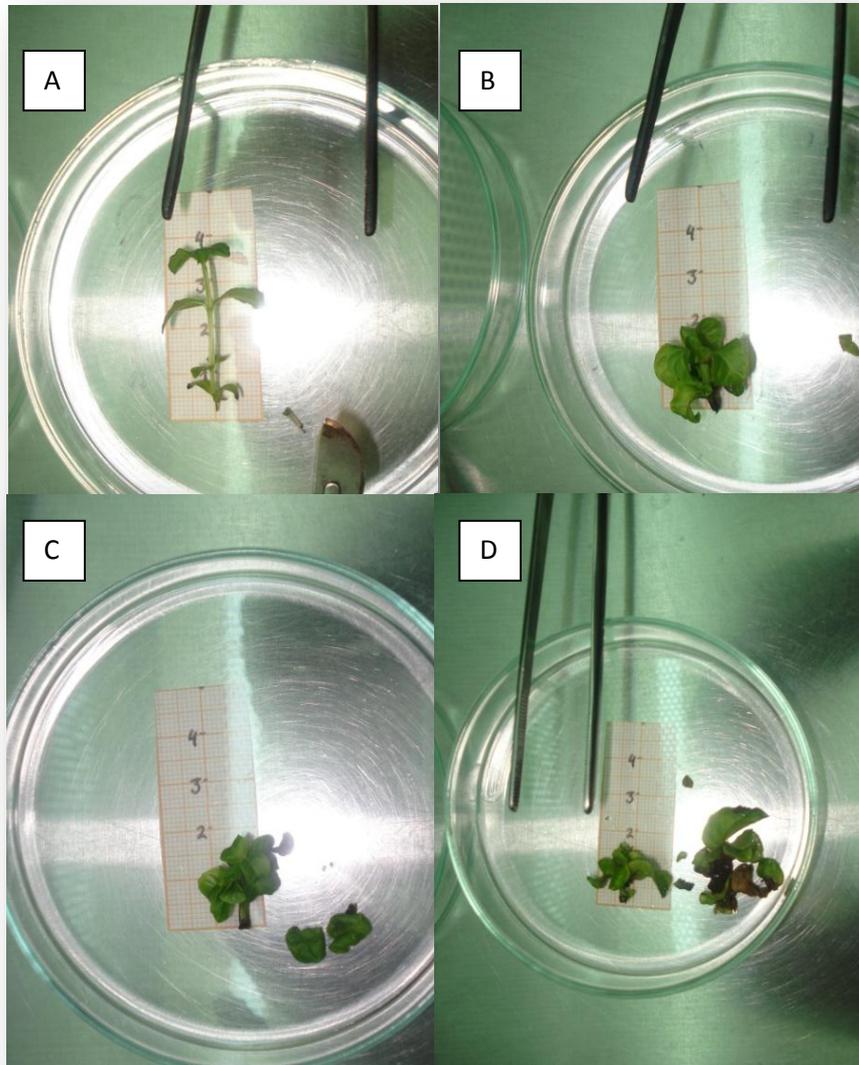


Figura 1. Explantes de guayabo selección 17-06 en etapa de multiplicación, 30 días después de iniciados los tratamientos de cuatro concentraciones de BAP. A.: en ausencia de BAP los explantes se alargaron y emitieron algunas raíces; B: a la concentración de $2.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ aumentó el número de brotes desarrollados; C: con la concentración de $4.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ los explantes presentaron forma de roseta al aumentar el número de nudos; D: la forma de roseta permaneció pero hubo senescencia de hojas a la concentración de $6.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

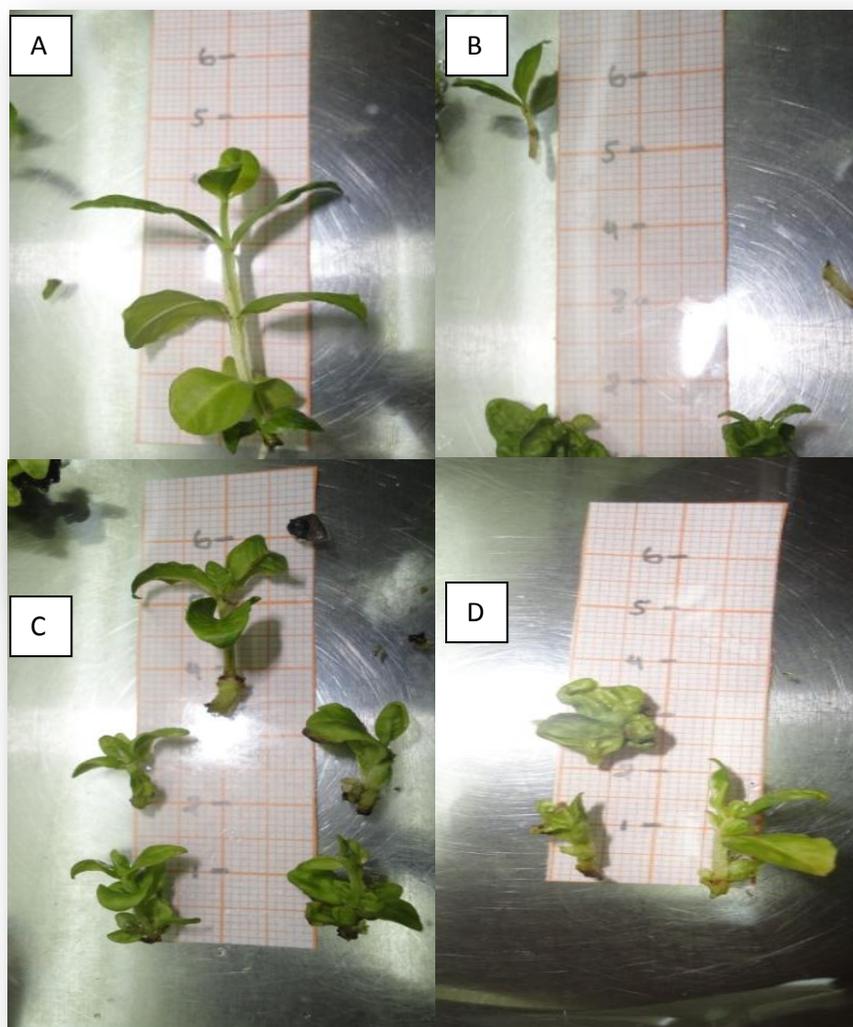


Figura 2. Explantes de guayabo selección RER en etapa de multiplicación, 30 días después de iniciados los tratamientos de cuatro concentraciones de BAP. A: Los explantes en ausencia de BAP aumentaron su longitud y emitieron raíces; B: Con la concentración de $2.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ se desarrolló mayor número de brotes pequeños que dificultan su subcultivo; C: Con la concentración de $4.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ se obtuvo el mayor número y longitud de brotes; D: Se observan pocos brotes de tamaño pequeño que dificulta su individualización a la concentración de $6.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

En el Cuadro 3 se presentan los resultados del análisis de varianza del efecto de los tratamientos de concentraciones de BAP en la fase de multiplicación de los genotipos 17-06 y RER, a los 60 días de iniciados los tratamientos. En él se muestra que para genotipos solo se encontraron diferencias significativas en la variable longitud inicial del explante; este efecto también se mantuvo para las concentraciones de BAP. En la interacción de ambos factores no se encontraron diferencias estadísticas.

Cuadro 3. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables de respuesta a las concentraciones de BAP en la etapa de multiplicación, a 60 días después de aplicados los tratamientos en los genotipos de guayabo 17-06 y Roja Exterior Redonda.

F.V.	G.L.	NB	LBI	LBM	CoM	NR	NN
Genotipo	1	0.031 ns	0.068 **	0.023 ns	0.032 ns	0.005 ns	0.026 ns
[BAP]	3	0.212 ns	0.053 **	0.023 ns	0.009 ns	0.035 ns	0.037 ns
Gen*[BAP]	3	0.029 ns	0.011 ns	0.003 ns	0.022 ns	0.005 ns	0.012 ns
Error	8	0.071	0.005	0.006	0.022	0.020	0.020 ns
Total	15						

Gen= genotipos; [BAP]= Concentración de BAP; ** Altamente significativo con $\alpha \leq 0.01$, *Significativo con $\alpha \leq 0.05$ y ns= no significativo. F.V. Fuentes de variación; G.L.=Grados de libertad. Variables: NB= Número de brotes; LBI= Longitud del explante inicial; LBM= Longitud promedio del brote; CoM= Coeficiente de multiplicación; NR= Número de Raíces; NN= Número de nudos.

La adición de BAP al medio de multiplicación favoreció la emisión de brotes en ambos genotipos, aunque éstos tuvieron diferentes respuestas, dependiendo de la concentración de la citocinina. El genotipo 17-06 tuvo la mejor respuesta a la concentración de $2.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para las variables número y longitud promedio del brote al obtener los valores más altos, 186 y 122 mm, respectivamente (Cuadro 4); en cambio, para el genotipo RER se presentaron los mayores valores en estas dos variables (1.91 brotes y 150 mm, respectivamente) a las concentraciones de 4.4 y $6.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, pero sin llegar a ser estadísticamente diferentes. No adicionar BAP al medio ($0.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) hizo que los explantes iniciales tuvieran mayor

longitud, y se encontraron diferencias estadísticas entre las concentraciones de BAP en ambos genotipos; un efecto contrario se presentó cuando los brotes se desarrollaron en el medio con una concentración de $6.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ donde se tuvieron los explantes iniciales de menor tamaño en ambos genotipos (165 mm para el genotipo 17 – 06 y 173 mm para RER).

Otro efecto que se observó y fue consistente con los resultados de la evaluación a los 30 días de iniciados los tratamientos fue que al no haber citocinina en el medio de multiplicación ($0.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) los explantes desarrollaron raíces, a diferencia de los demás tratamientos en donde no se produjeron aunque no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos.

El coeficiente de multiplicación fue afectado por el número de nudos y la longitud del explante inicial, y a su vez, estas variables cambiaron de acuerdo a la concentración de BAP en el medio. Para el genotipo 17-06 se tuvo un mayor CoM cuando no se añadió la citocinina ya que se aumentó la variable LBI, mientras que para el genotipo RER se obtuvo el mayor valor de CoM a la concentración de $4.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, en donde también aumentó el número de brotes (Cuadro 4). La mayor respuesta del genotipo RER a las distintas concentraciones de BAP se mantuvo desde la primera evaluación (30 días) hasta los 60 días de iniciados los tratamientos, lo que resulta de comparar las medias de las variables estudiadas.

Cuadro 4. Efecto de la concentración de BAP en la multiplicación *in vitro* de brotes de guayaba de los genotipos 17-06 y Roja Exterior Redonda, a 60 días después de aplicados los tratamientos.

Tratamientos ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	NB	LBI (mm)	LBM (mm)	CoM	NR	NN
17-06 + 0.0	1.20 a ^z	184 ab	100 a	1.73 a	1.26 a	2.11 a
17-06 + 2.2	1.86 a	166 b	122 a	1.72 a	1.00 a	1.95 a
17-06 + 4.4	1.70 a	175 b	111 a	1.58 a	1.00 a	2.26 a
17-06 + 6.6	1.57 a	165 b	106 a	1.52 a	1.00 a	2.08 a
Media	1.58	172	109	1.63	1.06	2.1
RER + 0.0	1.41 a	208 a	108 a	1.70 a	1.11 a	2.29 a
RER + 2.2	1.70 a	187 ab	121 a	1.68 a	1.00 a	2.13 a
RER + 4.4	1.91 a	176 b	125 a	1.83 a	1.00 a	2.23 a
RER + 6.6	1.67 a	173 b	150 a	1.69 a	1.00 a	2.08 a
Media	1.67	186	126	1.72	1.02	2.18
DMS	1.06	30	31	0.58	0.56	0.57
C.V.	16.41	4.28	7.10	8.82	13.66	6.71

NB: Número de brotes; LBI: Longitud del explante inicial; LBM: Longitud de brote; CoM: Coeficiente de multiplicación; NR: Número de raíces; NN: Número de nudos. ^zMedias con la misma letra en el sentido de columnas son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$

La dominancia apical se define como el control ejercido por el ápice caulinar sobre el crecimiento de las yemas laterales o axilares en la mayoría de las especies, este control se debe a la interacción entre auxinas y citocininas (Segura, 2008). Esta definición ayuda a explicar el comportamiento que tuvieron los explantes al

desarrollarse en medios con distintas concentraciones de BAP, ya que al crecer los explantes en ausencia de citocinina no se rompió la dominancia apical y el explante inicial siguió desarrollándose debido quizás a que los niveles endógenos de citocinina de los explantes era bajo, pues procedían de plantas crecidas bajo invernadero, lo cual coincide con la hipótesis planteada por Ali *et al.* (2003).

Al agregarse BAP al medio se rompió la dominancia apical lo cual disminuyó el crecimiento del explante inicial y promovió la brotación de las yemas axilares de los explantes. Ali *et al.* (2003) mencionan que en el cultivo *in vitro* de guayaba al usar bajas concentraciones de BAP en el medio de multiplicación ($0.25 - 0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) se obtienen menor número de brotes pero de mayor tamaño (2.1 brotes por explante de 1.6 cm) , resultados que no concuerdan con los obtenidos para los genotipos 17-06 y RER, ya que a bajas concentraciones (2.2 y $4.4 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} = 0.5$ y $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente) estos genotipos tuvieron un mayor desarrollo de brotes y de mayor tamaño (Cuadro 4).

Concentraciones altas de BAP ($8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) producen un efecto inhibitorio, como efecto de una concentración mayor a la óptima para la brotación de las yemas; este efecto lo observaron Ramírez y Salazar (1997) en un guayabo tipo 'Criolla Roja'. El efecto inhibitorio explica el bajo desarrollo mostrado por el genotipo 17-06 a concentraciones mayores de $2.2 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, mientras que para el genotipo RER el umbral óptimo puede llegar hasta $4.4 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

La síntesis de citocininas así como el control de sus niveles endógenos en la planta están regulados genéticamente (Segura, 2008), lo que explica porqué al multiplicar *in vitro* dos genotipos de guayabo con orígenes diferentes, en medios adicionados con distintas concentraciones de BAP, la respuesta de éstos no fue igual, además de que el umbral óptimo en la concentración de BAP puede ser diferente en cada genotipo.

Para tener éxito en la propagación *in vitro* de especies recalcitrantes como el guayabo, depende en su mayoría de la calidad de los explantes. La respuesta de los explantes a la micropropagación está determinada en gran parte por el genotipo, el estado

fisiológico de los tejidos y la época del año en que se propagan y colectan los explantes (Giri *et al.*, 2004).

Para justificar el uso de BAP en la etapa de multiplicación de guayaba se debe tomar en cuenta la variable CoM. En el genotipo 17-06 se observó que cuando no se añadió citocinina al medio, el coeficiente de multiplicación se comportó estadísticamente similar a los demás tratamientos, aunque numéricamente fue superior, esto se debió principalmente al crecimiento del explante inicial, ya que permitió la división de cada explante en varios segmentos nodales. El genotipo RER tuvo un comportamiento distinto ya que tuvo mayor CoM a la concentración de $4.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ producto del número mayor de brotes axilares y de tamaño óptimo para un mejor seccionamiento del explante inicial. Contrariamente, para una concentración de $6.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ el coeficiente de multiplicación disminuyó debido al acortamiento de los entrenudos del explante (forma de roseta) y al bajo desarrollo de los brotes laterales.

Para tener una mayor proliferación de brotes y que éstos tengan el tamaño adecuado para ser individualizados y así incrementar el coeficiente de multiplicación, se puede añadir al medio de multiplicación concentraciones bajas de auxinas, principalmente de AIB, tal como lo señalan Mishra *et al.* (2007) que obtuvieron una mayor brotación cuando usaron $4.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP y $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIB para guayabo del cultivar Pant Prabhat. Sin embargo, la omisión de la citocinina (BAP) en el medio de multiplicación no es recomendable ya que se promueve el desarrollo de raíces, entorpeciendo esta fase del cultivo *in vitro*.

El BAP es la citocinina más utilizada en la etapa de multiplicación *in vitro* de guayaba, debido principalmente a la alta inducción de brotación de este frutal, por la habilidad de sus tejidos para metabolizarla más fácilmente que otros reguladores sintéticos, o de la capacidad que tiene el BAP para inducir la producción de otras hormonas naturales como la Zeatina (Malik *et al.*, 2005).

B. Efecto del tiempo de subcultivo

La respuesta de los explantes de guayaba del genotipo RER sometidos a dos tiempos de subcultivo (30 y 45 días) se presenta en el Cuadro 5, en él se observa que con el aumento del periodo de subcultivo solo el número de brotes presentó diferencias estadísticas significativas.

Cuadro 5. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables longitud del explante, número de brotes, longitud de brote, coeficiente de multiplicación y número de nudos para los tratamientos subcultivo de 30 y 45 días.

F.V.	G.L.	NB	LE	LB	CoM	NN
Tratamientos	1	1.903*	0.235 ns	0.171 ns	1.210 ns	0.058 ns
Error	18	0.423	0.107	0.059	0.280	0.162
Total	19					

** Altamente significativo con $\alpha \leq 0.01$, *Significativo con $\alpha \leq 0.05$ y ns= no significativo. F.V. Fuentes de variación; G.L.=Grados de libertad. LE: Longitud inicial del explante; NB: Número de brotes; LB: Longitud promedio de brote; CoM: coeficiente de multiplicación; NN: Número de nudos.

Al aumentar el tiempo de subcultivos de 30 a 45 días, los explantes tuvieron un mayor desarrollo y crecimiento, observado como mayor número de brotes y éstos fueron de mayor longitud; también la longitud del explante inicial aumentó; sin embargo, solo hubo diferencias significativas en el número de brotes (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto promedio del tiempo de subcultivo en la multiplicación *in vitro* de brotes de guayaba de la selección Roja Exterior Redonda (RER).

Tratamientos	NB	LE (mm)	LB (mm)	CoM	NN
30 días	1.60 b ^z	198 a	52 a	2.12 a	4.00 a
45 días	2.21 a	219 a	70 a	2.61 a	4.10 a
Promedio	1.90	209	61	2.37	4.05
DMS	0.611	308	229	0.49	0.38
C.V.	34.1	15.7	39.7	22.3	9.9

LE: Longitud del explante inicial; NB: Número de brotes; LB: Longitud promedio de brote; CoM: coeficiente de multiplicación; NN: Número de nudos. ^zMedias con la misma letra en el sentido de columnas son iguales, de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

La formación de brotes permite que el coeficiente de multiplicación se pueda incrementar y ampliar el periodo de subcultivo de 30 a 45 días ayuda a que la longitud de los brotes aumente y que éstos puedan ser individualizados en el subcultivo. Un efecto que sucede con el aumento del periodo de subcultivo es que el BAP se agota y por consiguiente, se elimina la dominancia apical, lo que le permite al explante inicial alargarse y se pueda dividir en más secciones nodales, lo que se traduce en un mayor CoM. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Pérez (2002) quien al realizar subcultivos de 45 y 60 días encontró que el coeficiente de multiplicación aumentó numéricamente. Los subcultivos por periodos mayores de 30 días podrían ser imprácticos, ya que no se encontraron diferencias estadísticas en la mayoría de las variables estudiadas.

Etapa de enraizamiento

Los resultados del ANAVA del efecto de los dos reguladores de crecimiento de tipo auxínico (AIA y ANA) en la fase de enraizamiento de guayaba del genotipo RER, 45 días después de iniciados los tratamientos, se presentan en el Cuadro 7. Estos resultados muestran que sólo hubo diferencias significativas en el incremento de la longitud del explante inicial (INL) pero no en las variables relacionadas con el enraizamiento.

Cuadro 7. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables de respuesta a dos reguladores de crecimiento AIA y ANA en la etapa de enraizamiento, 45 días después del inicio de los tratamientos, en el genotipo de guayabo Roja Exterior Redonda.

F.V.	G.L.	NB	NR	LR	INL	INN
Tratamientos	3	0.077 ns	0.159 ns	0.012 ns	0.033 *	0.059 ns
Error	12	0.092	0.148	0.010	0.066	0.015
Total	15					

** Altamente significativo con $\alpha \leq 0.01$, *Significativo con $\alpha \leq 0.05$ y ns= no significativo. F.V. Fuentes de variación; G.L.=Grados de libertad. NB: Número de brotes; NR: Número de raíces; LR: Longitud de raíz; INL: Incremento longitud del explante; INN: Incremento en el número de nudos del explante inicial.

Numéricamente la adición de AIA al medio de enraizamiento promovió la emisión de más raíces y de mayor tamaño, comparado con el medio que no tuvo reguladores (MS). Cuando se combinó la aplicación al medio de ambas auxinas (AIA + ANA), el incremento en la longitud del explante inicial fue significativamente menor que cuando los explantes se desarrollaron en ausencia de ellas (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto de dos hormonas de tipo auxínico sobre el enraizamiento *in vitro* de guayaba de la selección Roja Exterior Redonda, 45 días después del inicio de los tratamientos.

Tratamientos	NB	NR	LR	INL	INN
			(mm)	(mm)	
MS	1.18 a ^z	1.65 a	112 a	141 a	1.43 a
AIA	1.51 a	1.69 a	116 a	136 ab	1.36 a
ANA	1.30 a	1.63 a	112 a	126 ab	1.21 a
AIA + ANA	1.32 a	1.26 a	103 a	121 b	1.17 a
Promedio	1.33	1.56	111	131	1.29
DMS	0.64	0.81	211	164	0.26
C.V.	22.8	24.7	9.1	5.9	9.7

NB: Número de brotes; NR: Número de raíces; LR: Longitud de raíz; INL: Incremento longitud del explante; INN: Incremento número de explantes. ^zMedias con la misma letra en el sentido de columnas son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$

Los requerimientos de auxinas en la fase de enraizamiento *in vitro* de guayabo están influenciados por el origen de los explantes, el tipo y la concentración de los reguladores de crecimiento aplicados durante las fases de establecimiento y multiplicación, además de la edad de la planta (Amin y Jaiswal, 1987, 1988); Mohamed-Yasseen *et al.*, 1995 y Ali *et al.*, 2003). Explantes provenientes de plantas crecidas en condiciones de invernadero tuvieron un menor número de raíces y de menor tamaño en comparación con los provenientes de los derivados de brotes *in vitro* (Ali *et al.*, 2003). Como las plantas madre solo tenían dos años de edad, se esperaría que los requerimientos de auxinas en el medio de enraizamiento para el genotipo RER fueran menores, ya que en el medio sin AIA y en la concentración de $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ se obtuvo 50 % de enraizamiento, resultados que se pueden comparar con los obtenidos por Ali *et al.* (2007) quienes en árboles de cinco años de edad del Cv. Safeda, con una

concentración de $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, obtuvieron 56 % de emisión de raíces, mientras que utilizando una combinación de AIA y AIB con una concentración de $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ cada una, obtuvieron 90 % de explantes con raíces.

En este caso, para el genotipo RER, la combinación de AIA y ANA tuvo efectos negativos sobre su enraizamiento ya que se tuvieron los valores más bajos para las variables evaluadas; posiblemente una concentración de ANA de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ya está presentando un efecto inhibitorio como se muestra en la Figura 3, ya que los resultados obtenidos por Concepción (2007) muestran que para la variedad Enana Roja Cubana EEA 18-40, una concentración de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA promovió el enraizamiento en 85 % y en combinación con una concentración igual de AIB obtuvieron 100 % de enraizamiento de explantes de guayabo propagados *in vitro*.

Por otro lado, Shah *et al.* (2008) informan que para el Cv. Safeda una combinación de AIB y ANA en concentraciones de 1.5 y $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente, genera 85 % de explantes enraizados; estos mismos autores encontraron que la adición de ANA en el medio de enraizamiento disminuye los días que toma a los explantes emitir las raíces y aumenta el número de raíces por explante. Datos que no concuerdan con los resultados obtenidos para el genotipo RER ya que al cabo de 45 días los explantes con raíces fueron menos de 25 %.

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

El hecho de que los explantes de guayabo, en este caso del genotipo Roja Exterior Redonda, desarrollen raíces en medio MS sin auxinas, se puede deber a que las auxinas son sintetizadas principalmente en los meristemos y a que existen varios mecanismos que regulan su concentración endógena en los tejidos u órganos de la planta, como son: velocidad de biosíntesis, hidrólisis de conjugados y oxidación, así como la intensidad del transporte (Acosta *et al.*, 2008).

Una característica que puede explicar la variación en la respuesta de diversos materiales de guayabo es que la sensibilidad de un tejido u órgano a las auxinas varía conforme a la edad y las condiciones ambientales.

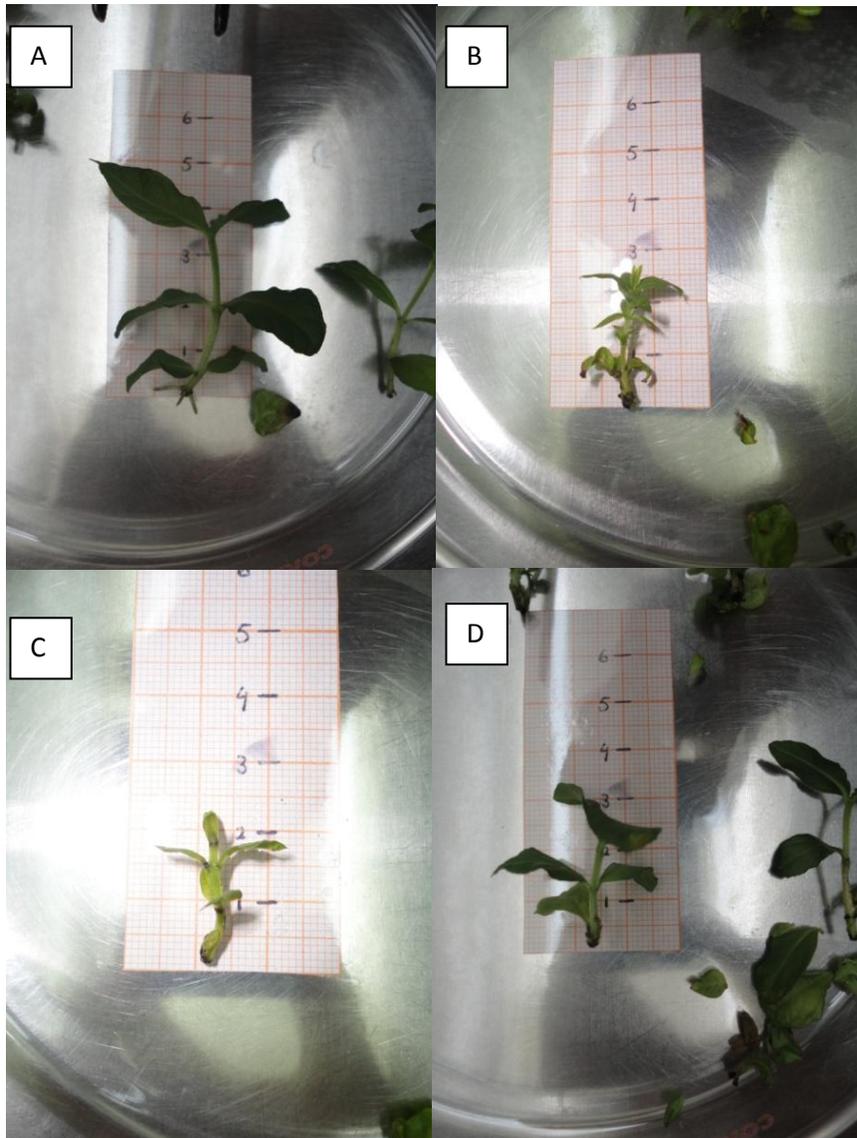


Figura 3. Explantes de guayabo selección RER en etapa de enraizamiento, utilizando dos distintos reguladores de crecimiento de efecto auxínico, a 45 días de iniciados los tratamientos. A: En medio basal MS los explantes aumentaron su longitud y emitieron raíces; B: Se observó que al adicionar el medio basal MS con AIA el número de raíces y su longitud aumentaron, sin embargo, solo se obtuvo un 50 % de explantes enraizados; C: Al añadir ANA al medio basal MS los explantes no se desarrollaron y menos del 50 % emitió raíces; D: una combinación de ambos reguladores de crecimiento (MS + AIA + ANA) presentaron el número más bajo de raíces y de menor tamaño.

V. CONCLUSIONES

Con base en los objetivos planteados y en los resultados obtenidos en la presente investigación se puede concluir:

1. Fue posible generar un protocolo para la propagación *in vitro* de la selección de guayaba Roja Exterior Redonda a partir de yemas vegetativas, mientras que para 17-06 se tuvieron avances significativos en su establecimiento y multiplicación.
2. A partir de brotes obtenidos *in vitro*, para la selección Roja Exterior Redonda durante la fase de multiplicación, la concentración de $4.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP generó un mayor número de brotes y de mayor tamaño, así como un coeficiente de multiplicación más alto. Mientras que para la selección 17-06 los mejores resultados se obtuvieron con $2.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de la citocinina.
3. Durante la etapa de multiplicación, el periodo de subcultivo de 45 días favoreció el crecimiento y el desarrollo de los brotes de la selección Roja Exterior Redonda; sin embargo, hubo emisión de raíces que dificultan el subcultivo, lo que es impráctico.
4. La adición de AIA al medio MS en la etapa de enraizamiento de la selección Roja Exterior Redonda presentó el mayor número y longitud de raíces, sin haber diferencias significativas con los demás tratamientos. Mientras que al utilizar medio MS los explantes solo mostraron mayor desarrollo.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, E. M.; Sánchez, B. J.; Bañón, A. M. 2008. Auxinas, pp. 421-444 .*In*: Azcón-Bieto, J. y Talón, M. Fundamentos de fisiología vegetal. McGraw-Hill. Barcelona, España.
- Acosta, M.; Caballero, I.; Alvarado, Y.; Leiva, M. 2002. Microbiota epifítica y contaminantes fungosos del establecimiento *in vitro* de la guayaba (*Psidium guajava* L.). *Biotechnología Vegetal* 2 (2): 67-71.
- Ali, N.; Mulwa, R. M. S.; Norton, M. A.; Skirvin, R. M. 2003. Micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.). *Journal of Horticultural Science & Bototechnology* 78 (5): 739-741.
- Ali, N.; Mulwa, R. M. S.; Norton, M. A.; Skirvin, R. M. 2007. Radical disinfestations protocol eliminates *in vitro* contamination in Guava (*Psidium guajava* L.) seed. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 91: 295-298.
- Amin, M. N.; Jaiswal, V. S. 1987. Rapid clonal propagation of guava through *in vitro* shoots proliferation on nodal explants of mature trees. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 9: 235-244.
- Amin, M. N.; Jaiswal, V. S. 1988. Micropropagation as an aid to rapid cloning of a guava cultivar. *Scientia Horticulturae* 36: 89-95.
- Anderson, W. C. 1980. Mass propagation by tissue culture: Principles and techniques. *In*: Proc. Conf. on nursery production of fruit plants through tissue culture application and feasibility. U.S. Dept. Agr. Sci. & Educ. Adm., ARR-NE 11:1-10.
- 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.

- Baker, 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.
- Barcelo, J.; Nicolás, G.; Sabater, B.; Sánchez, R. 1995. *Fisiología Vegetal*. 6ª ed. Ediciones Pirámide S.A. Madrid, España. 662 p.
- Borkowska, B. y Jankiewicz, S. L. 2003. Citocininas. *In: Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas*. Jankiewicz, L.S. (Coordinador). Mundi Prensa y UACH, México, D.F. 487p.
- Bourke, O. D. D. 1975. *Psidium guajava* L. Guava. Commonwealth bureau of horticulture and plantation crops. New York, USA. pp 530-553.
- Bressan, P. H.; Kim, Y. K.; Hyndman, S. E.; Hasegawa, P. M.; Bressan, R. A. 1982. Factors affecting *in vitro* propagation of rose. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107: 979-990.
- Cañizares, J. Z. 1968. El guayabo y otras Mirtáceas. Edición Revolucionaria. La Habana. Cuba. 87p.
- Chandra, R.; Bajpai, A.; Gupta, S.; Tiwari, R. K. 2004. Embryogenesis and plant regeneration from mesocarp of *Psidium guajava* L. (guava). Indian J. Biotech 3: 246-248.
- Chandra, R. y Mishra, M. 2007. Biotechnological Interventions for Improvement of Guava (*Psidium guajava* L.) Acta Hort. 735: 117-126.
- 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.
- Collado, R.; Agramonte, D.; Jiménez, F.; Ramírez, D. 2005. Estudio en condiciones de campo de líneas micropropagadas seleccionadas de guayaba del cultivar EEA 18-40. Cultivos Tropicales 26 (2): 21-24.
- Díaz. M. D. H. 2002. Fisiología de árboles frutales. AGT EDITOR S.A. México. 390 p.

- Dinesh, M. R. y Lyer, C. P. A. 2005. Significant research achievement in guava— improvement and future needs, pp 7–16. *In*: Kishun, R. Mishra, A. K.; Singh, G.; Chandra, R. (eds). Proceeding of 1st International Guava Symposium. CISH, Lucknow, India.
- Driver, J. A.; A. H. Kuniyuki. 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *Hortsci.* 19: 507-509.
- George, E. F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Exegetics Ltd. 524p.
- Giri, C.; Shyamkumar, B.; Anjaneyulu, C. 2004. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Trees Struct. Funct.* 18: 115-135.
- González, G. E.; Padilla-Ramírez, J. S.; Reyes-Muro, L.; Perales de la Cruz, M. A.; Esquivel-Villagrana, F. 2002. Guayaba: su cultivo en México. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural y Alimentación, INIFAP, Centro de Investigación Regional Norte Centro, Campo Experimental Pabellón; Aguascalientes, México. 182 p.
- Hayes, W. B. 1960. The guava and it's relatives. Fruit growing in India. 3^{ra} Edition. Kitabistan, AllaHabad, India. pp. 283-299.
- Jaiswal, V. S.; Amin, M. N. 1987. *In vitro* propagation of guava from shoot culture of mature trees. *Plant Phisiol.* 130: 7-12.
- Jankiewics, L. S.; Acosta, Z. C. 2003. Auxinas, pp. 21-66. *In*: Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas. Jainkiewics, L. S. (Coordinador). Mundi Prensa y UACH, México, D.F.
- Lakshmi Sita, G.; Vaidyanathan, C. S.; Ramakrishnan, T. 1982. Applied aspects of plant tissue culture with special reference to tree improvement. *Curr. Sci.* 51: 88-92.
- León, de S. S.; Arenas, L.; Voloria, Z. 1997. Efecto de la exposición solar de plantas donantes en la iniciación del cultivo *in vitro* del guayabo (*Psidium guajava* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 14: 47- 53.

- List, S. E.; Brown, P. H.; Low, C. S.; Walsh, K. B. 1996. A micropropagation protocol for *Melaleuca alternifolia* (tea tree). *Aust. J. Exp. Agriculture* 36: 755-60.
- Litz, R. E.; Jaiswal, V. S. 1991. Micropropagation of tropical and subtropical fruits, pp 247-263. *In: Debergh, P. C.; Zimmerman, R. H. (eds). Micropropagation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.* Lloyd, G.; McCown, B. 1981. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc. Int. Plant Propag. Soc.* 30: 421–427.
- Loh, C. S. y Rao, A. N. 1989. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from seedlings and grafted plants and adventitious shoot formation *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 39: 31-39.
- Malik, S. K.; Chaudhury, R.; Kalia, R. K. 2005. Rapid *in vitro* multiplication and conservation of *Garcinia indica*: a tropical medicinal tree species. *Sci. Hort.* 106:539–553.
- Manica, I. 2000. Taxonomía a goiabeira, pp. 23-36 *In: Fruticultura tropical, goiaba. Manica, I. (ed). Ed. Cinco Continentes, LTDA., Porto Alegre, Brazil.*
- Martínez, de L. J.; Barrientos, L. M. C.; Reyes, A. C.; Hernández, D. S.; Padilla, R. J. S.; Mayek, P. N. 2004. Diversidad fenotípica y genética en huertas de guayabo de Calvillo, Aguascalientes. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27 (3): 243-249.
- Mata, B. I.; Rodríguez, M. A. 2000. Cultivo y producción del guayabo. Ed. Trillas. México, D.F. 160 p.
- Mishra, D. S.; Tiwari, J. P.; Shant, L. 2007. *In vitro* cloning of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Pant Prabhat. *Acta Hort.* 735: 127-132.
- Mishra, D. S.; Lal, B.; Pandey, D. 2007. Clonal multiplication of *Psidium* Species with mound layering. *Acta Hort.* 735: 339-342.
- Mishra, M.; Chandra, R.; Pati, R.; Bajpai, A. 2007. Micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.) *Acta Hort.* 735: 155-158.

- Mohamed-Yasseen, Y.; Barringer, S. A.; Schnell, R. J.; Splittstoesser, W. E. 1995. *In vitro* shoot proliferation of guava (*Psidium guajava* L.) from germinated seedlings. Plant Cell Reports 14: 525-528.
- Morton, J. 1987. Guava, pp: 356-363. *In: Fruits of warm climates*. Miami, FL.
- Mroginski, L.; Sansberro, P.; Flaschland, E. 2004. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales, pp. 35-42. *In: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Editores Echenique, V.; Rubinstein, C.; Mroginski, L. Ed. INTA. Buenos Aires, Argentina.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 25:135-166.
- Murashige T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
- Nakasone, H. Y. y Paul, R. E. 1998. Guava, pp. 149-172. *In: Tropical Fruits*. Atherton J. (ed). Crop. Production. Science in Horticulture Series. CAB International. Honolulu, Hi, USA.
- 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.
- Oltramari, A. C.; Dal Vesco, L. L.; Pedrotti, E. L.; Ducroquet, J. P. H. J.; Nodari, R. O.; Guerra, M. P. 2000. Protocolo de micropropagação da goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret) *Ciência Rural* 30 (1): 61-68.
- 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.; Perales de la C. M. A. 2010. Nuevas Variedades de Guayaba (*Psidium guajava* L.). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Aguascalientes, México. Folleto Técnico 42. 30 p.

- 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.
- Pennington, T. D.; Sarukan, J. 1968. Manual para la identificación de campo de los principales árboles tropicales en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. México, D.F. 413 p.
- Peña, H. A.; Díaz, J. A.; Martínez T. R. 1996. Fruticultura Tropical. 2^{da} Parte. ICFES. Santa Fe de Bogotá. Colombia. 208 p.
- Pérez, A. T.; Nápoles, L.; Concepción, O.; Trujillo, R. 2002. Multiplicación *in vitro* de brotes de guayaba (*Psidium guajava* L.) Var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 obtenidos a partir de semilla. *Cultivos Tropicales* 23 (3): 57-61.
- Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. 301 p.
- Piñol, M. T.; Palazón, J.; Cusidó, R. M. 2000. Introducción al metabolismo secundario, pp. 261-283. *In: Azcón-Bieto, J. y Talón, M. Fundamentos de Fisiología Vegetal.* McGraw-Hill. Barcelona, España.
- Pontikis, C. A. 1996. *Psidium guajava* L. *In: Bajaj, Y.P.S. (ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Trees* 35 (IV) 308-320.
- Radice, S. 2004. Morfogénesis *in vitro*, pp. 25-33. *In: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal.* Editores Echenique, V.; Rubinstein, C.; Mroginski, L. Ed. INTA. Buenos Aires, Argentina.
- Rai, M. K.; Asthana, P.; Jaiswal, V. S.; Jaiswal, U. 2010. Biotechnological advances in guava (*Psidium guajava* L.): recent developments and prospects for further research. *Trees* 24: 1- 12.
- 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-Villalobos M.; León, S. S.; Urdaneta 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
- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Consultado 12 de abril de 2008. Disponible <http://www.siap.gob.mx/>.
- Samson, J. A. 1986. Tropical Fruits. Edit. Longman, New York. pp: 270-275.
- Segura, J. 2008. Citoquininas, pp. 421-444. *In: Azcón-Bieto, J. y Talón, M. Fundamentos de fisiología vegetal.* McGraw-Hill. Barcelona, España.
- Shah, S. T.; Zamir, R.; Ahmad, J.; Ali, H.; Lutfullah, G. 2008. *In vitro* regeneration of plantlets from seedling explants of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Safeda. Pak. J. Bot. 40:1195–1200.
- SIACON (Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta). 2008. Consultado el 14 de noviembre de 2010. Disponible: <http://www.siap.gob.mx>
- Singh, A., 1986. Fruit Physiology and Production. Kalyani, New Delhi, pp. 328-331.
- Singh, M.; Jaiswal, U.; Jaiswal, V.S. 2004. *In vitro* regeneration and improvement in tropical fruit trees: an assessment, pp. 228-243. *In: Srivastava, P.S.; Narula, A.; Srivastava, S. (eds). Plant biotechnology and molecular markers.* Anamanya Publishers, New Delhi.
- Singh, S. K.; Singh, S. P.; Sharma, H. C. 2001. *In vitro* clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from field-grown mature plants. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 7: 33-38.
- Styer, D. J.; Chin C. K. 1983. Meristem and shoot-tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm conservation. *Horticultural Revivs* 5: 221-277.

- Thorpe, T. A.; Harpy, I. S.; Kumar, P. P. 1991. Application of micropropagation to forestry, pp. 311-336. *In*: Debergh, P. C.; Zimmerman R. H. (eds). Micropropagation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Tong, K. L.; Khay, C. K. 1991. Guava in Malaysia, production, pests and diseases. Ed. Tropical Press SDN. BHD. Kuala Lumpur, Malaysia. 260 p.
- Toussaint, A. N.; Lebrunt, A.; Roggemans, J. 1992. Cutting and *in vitro* propagation of *Eugenia smithii* Poir. *Acta Horticulturae* 314: 77-83.
- Uribe, M. M.; Cifuentes, G. L. 2004. Aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en la propagación de *Legrandia concinna*. *Bosque* 25 (1): 129-135.
- Velázquez, S. R.; Sandrea, Y.; Betancourt, C.; Mata, J.; García, F. 2006. Embriogénesis somática en cultivares de cacao venezolanos. *Agronomía Trop.* 56 (1): 61-74.
- Vietez A. M.; Vietez, E. 1980. Plantlet formation from embryonic tissue of chestnut grown *in vitro*. *Physiol. Plant.* 50: 127-130.
- Villalobos, A. V. M.; García, V. A. 1982. Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) libres de virus por cultivo *in vitro* de meristemas y ápices vegetativos. *Agrociencia* 48:107-118.
- Villalobos, A. V. M.; Leung, D. W. M.; Thorpe, T. A. 1984. Light-cytokinin interaction in shoot formation in cultured cotyledon explants of radiata pine. *Phyiol. Plant.* 61: 497-504.
- Yadava, U. L. 1994. Physicochemical properties of guava produced in Georgia. *Hort. Science* 29: 536-537.
- Yadava, U. L. 1996. Guava production in Georgia under cold-protection structure, pp. 451-457. *In*: J. Janick (ed.), *Progress in new crops*. ASHS Press, Arlington, VA.
- Zamir, R. N.; Shah, S. T.; Muhammad, T.; Shah, S. A. 2007. *In vitro* re-generation of guava (*Psidium guajava* L.) from shoot tips of mature trees. *Pak. J. Bot.* 39 (7): 2395-2398.

Zimmerman, R. H. 1988. Cultivo de tejidos, pp. 167-181. *In*: Métodos genotécnicos en frutales Editores Moore, J. N.; Janick, J. AGT EDITOR, S.A. México.