

1990 - B

Reg. No. 083334754

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



FACULTAD DE CIENCIAS  
HERBARIO

“MICROPROPAGACION DE GUAYABILLO

Psidium sartorianum (Berg.) Niedenzu”

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

CESILIA GONZALEZ ESTRADA

GUADALAJARA, JALISCO 1992



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Sección .....  
 Expediente .....  
 Número .....

**C. CESILIA GONZALEZ ESTRADA.**  
**P R E S E N T E.**

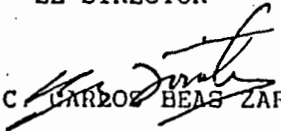
Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "MICROPROPAGACION DE GUAYABILLO-Psidium sartorianum (Berg.) Niedenzu" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el Dr. Benjamín Rodríguez Garay.



FACULTAD DE  
 CIENCIAS BIOLÓGICAS

**A T E N T A M E N T E**  
**"PIENSA Y TRABAJA"**  
**"AÑO DEL BICENTENARIO"**  
 Guadalajara, Jal., 14 Enero de 1992.  
**EL DIRECTOR**

M. EN C.  BEAS ZARATE

**EL SECRETARIO**



M. EN C. MARTÍN FEDRO TENA MEZA

c.c.p.- El Dr. Benjamín Rodríguez G., Director de tesis.pte.-  
 c.c.p.- El expediente del alumno.  
 CDZ>MPTM>CgIr.



CENTRO DE INVESTIGACION Y ASISTENCIA EN TECNOLOGIA  
Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO A.C.

2 Junio de 1992

M.C. Juan Luis Cifuentes Lemus  
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas  
PRESENTE

Por medio de la presente me permito informarle que después de haber revisado el manuscrito de la tesis de la Pasante de Biología Cesilia González Estrada titulada "Micropropagación de guayabillo *Psidium sartorianum* (Berg) Niedenzu" la cual fue realizada bajo mi dirección en el Departamento de Cultivo de Tejidos del CIATEJ, A.C., considero que no existe ningún inconveniente y doy mi aprobación para la impresión final de la misma.

ATENTAMENTE

Dr. Benjamin Rodríguez Garay.  
Director de tesis.

Esta tesis fue realizada con el apoyo económico de la Dirección General de Conservación Ecológica de los Recursos Naturales de la Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología (SEDUE), como parte del proyecto "Micropropagación in vitro de especies vegetales económica y ecológicamente importantes en la zona norte del estado de Quintana Roo", según contrato No. B9-W-CE-A-005-Y-09.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de proyectos especiales de la División de Biotecnología. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ A.C.).

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Asociación Civil (CIATEJ A.C.) por haber permitido la realización de éste trabajo.

Mi agradecimiento al Director de Tesis Dr. Benjamín Rodríguez Garay por el apoyo que me brindó.

Agradezco al Dr. Gonzalo Flores Martínez por su gran ayuda, motivación y valiosa asesoría en el trabajo estadístico.

## DEDICATORIAS

### A MIS PADRES:

Por el amor, confianza y el apoyo  
que siempre me han brindado.

### A MIS HERMANOS:

Por la motivación en seguir adelante  
en mi formación y la ayuda  
que en todo momento me han dado.

## INDICE

	Pag.
Introducción.	1
Antecedentes.	7
Hipótesis.	18
Objetivos.	19
Materiales y métodos.	20
Resultados.	34
Discusión.	49
Conclusiones.	55
Bibliografía.	56



## I. INTRODUCCION

La Biotecnología es una área de la Biología, la cual es un conjunto de tecnologías cuyo objetivo es el manejo y utilización intensiva de agentes biológicos (catalizadores biológicos, microorganismos, enzimas, células animales y células vegetales) con el fin de producir bienes y servicios con utilidad económica y social. La Biotecnología ha tenido grandes aplicaciones en la industria farmacéutica, química, alimentaria, la medicina humana, y en la agricultura, siendo en ésta área muy útil la técnica de cultivo de tejidos vegetales y las modernas técnicas de ingeniería genética (Hughees, 1981; Quintero, 1984).

El cultivo de tejidos vegetales es una serie de técnicas que se refieren al cultivo in vitro (con medios nutritivos adecuados) de casi cualquier parte de la planta (hojas, raíz, tallo, frutos, meristemos, anteras, etc..) bajo condiciones asépticas.

El cultivo de tejidos vegetales se basa en el principio de totipotencialidad de la célula vegetal, según la cual todas las células de una planta son capaces de expresar su potencial genético y fisiológico para regenerar una planta completa, siempre y cuando las células sean provistas de condiciones adecuadas para su desarrollo. Una de las condiciones es el medio de cultivo básico, que debe contener diferentes aditivos como elementos inorgánicos (mayores y menores), una fuente de carbono eficiente (glucosa, sacarosa, etc..), vitaminas, ácido cítrico, ácido ascórbico, diferentes compuestos orgánicos como extracto de

levadura, endospermo de coco, aminoácidos y reguladores del crecimiento entre otros. De ésta manera se ofrece a las células y tejidos en cultivo todos los nutrientes indispensables para su desarrollo. El pH del medio es también un factor importante, el más utilizado es pH moderadamente ácido (5-5.8). Los parámetros físicos de incubación, tales como la luz, fotoperiodo y temperatura se deben de controlar. Todos éstos factores influyen poderosamente en la expresión final de los tejidos (Auge et al, 1982; Bidwell, 1983; Quintero, 1984; Robert y Loyola, 1985; y Villalobos, 1985).

La Biotecnología Vegetal está marcando el inicio de una nueva era de cambios profundos en los sistemas de producción agrícola en el mundo, aplicando las técnicas de micropropagación (Rubluo, 1990). La micropropagación o propagación in vitro se define como la multiplicación masiva de una especie a partir de células, tejidos u órganos en condiciones in vitro, lo que involucra la desinfección superficial del explante y su proliferación en un medio de cultivo sintético y bajo condiciones físicas controladas (Villalobos et al, 1985).

En los sistemas de micropropagación se reconocen cuatro etapas secuenciales:

#### Etapa I. Establecimiento :

La función de ésta etapa es establecer al explante en el medio de cultivo e inducir el desarrollo de brotes múltiples para la multiplicación posterior. El medio a seleccionar varía según la especie. El control del desarrollo se logra manipulando las concentraciones de auxinas y citocininas.

#### Etapa II. Multiplicación :

Una vez que los explantes generan brotes, se separan los propágulos y se transplantan a un medio de cultivo fresco. Al medio de cultivo se le aumenta la concentración de citocininas; es necesario experimentar y así ajustar las concentraciones de auxinas y citocininas para optimizar la tasa de multiplicación y la producción de plantas uniformes. Las etapas de multiplicación pueden repetirse varias veces para aumentar la provisión de material hasta cierto número, para su enraizamiento y trasplante posterior a tierra (invernadero y/o campo).

#### Etapa III. Enraizamiento :

El objetivo del pretrasplante es preparar a las plantas para transplantarlas del medio artificial heterótrofo del frasco de cultivo a una existencia de vida libre autótrofa en el invernadero y luego a su sitio definitivo. Esta preparación implica el enraizamiento y un cambio en la fisiología de las plántulas que estimule la fotosíntesis, la absorción de agua y nutrientes por las raíces y la resistencia a la desecación y a los organismos patógenos.

#### Etapa IV. Trasplante :

Las plantas enraizadas se sacan del recipiente de cultivo, se retira completamente el agar que llevan adherido en las raíces, para remover una fuente potencial de contaminación y se transplanta a una mezcla de suelo estándar, en macetas pequeñas en una forma más o menos convencional. En cultivos in vitro, las

plántulas crecen generalmente en condiciones de alta humedad y baja luz. Las plántulas extraídas de los cultivos in vitro son muy susceptibles al marchitamiento, desecación e infección. La humedad durante el período inmediato posterior al trasplante debe ser cuidadosamente controlada. Períodos de aclimatación gradual con decremento de humedad son necesarios para que las plantas sobrevivan la transición.

En algunas especies resulta esencial apearse estrictamente a ésta secuencia, mientras que en otras puede variarse para ser adaptada a los requerimientos de la especie (Mott, 1981; Hartmann and Kester, 1989).

Las técnicas de micropropagación dan solución a problemas agrícolas, hortícolas y forestales y cobran una mayor importancia en la actualidad cuando los problemas alimenticios y demográficos son particularmente agudos (Quintero, 1984).

México es un país que a pesar de sus cuantiosos recursos forestales, año con año se han incrementado substancialmente las importaciones de productos de origen forestal. La creciente necesidad de éstos productos hace pensar que el desarrollo de la industria forestal basada en bosques naturales no será autosuficiente en el futuro, en virtud de que la curva de la demanda es mucho más pronunciada que la de la oferta actual. Además, factores naturales como huracanes, incendios, plagas y enfermedades ocasionan devastaciones en los ecosistemas. En los bosques, el aprovechamiento forestal se ha basado en poblaciones silvestres de especies de importancia económica y ecológica reduciendo el número de árboles por unidad de área, problema que se vuelve una necesidad ecológica de reforestación. Todo lo

anterior nos encamina al área de cultivo de tejidos vegetales. El desarrollo de ésta técnica, ha surgido como una alternativa a los métodos convencionales con los cuales hay dificultad de propagar especies forestales; por los niveles de multiplicación que pueden ser alcanzados, tiene la ventaja de que es posible llegar a producir plantas en cantidad suficiente, a partir de material genéticamente seleccionado para tener plántulas disponibles después de algún desastre o cuando el número de árboles de importancia ecológica es reducido. Este trabajo tiene ésta finalidad, además de incrementar el conocimiento científico sobre las especies forestales. Además, aunque el guayabillo Psidium sartorianum es una especie que se encuentra distribuida en la vertiente del Golfo desde el norte de Chiapas y sur de Tabasco hasta la península de Yucatán y en la vertiente del Pacífico desde Sinaloa, pasando por Jalisco hasta Chiapas incluyendo la cuenca del Río Balsas (Penington y Sarukhan, 1968), solamente en el estado de Quintana Roo hay poblaciones silvestres reducidas, por haber sido una de las especies más dañadas por el huracán "Gilberto". Psidium sartorianum tiene gran importancia ecológica por ser fuente de alimento para la fauna del ecosistema y forma parte de la vegetación primaria del bosque tropical en éste estado. Secundariamente, por el uso que el hombre le ha dado, ya que su madera se utiliza para la construcción. Por éstas razones ha sido seleccionada ésta especie en el presente trabajo de tesis para lograr su propagación mediante el cultivo de tejidos vegetales.

La elección de ésta técnica se debe a las aplicaciones

prácticas que ofrece, entre las que están:

- Alta capacidad regenerativa.
- Obtención de plantas durante todo el año.
- Acelera las tasas de crecimiento.
- Acorta el tiempo en las diversas etapas del ciclo biológico en aquellas especies cuyo ciclo de vida es muy lento y la producción de semillas requiere largos periodos de tiempo y tienen una viabilidad baja (Murashige, 1974).

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. BREVE HISTORIA DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES :

Desde hace 120 años aproximadamente, en las investigaciones de fisiología vegetal se ha utilizado la técnica de cultivo de tejidos, órganos y células vegetales (Street, 1977).

Los primeros intentos en esta técnica fueron realizados por Sacks en 1860 y Knops en el año siguiente, quienes observaron que los principales nutrientes de las plantas superiores eran sustancias inorgánicas, y proporcionaron una solución nutritiva que las contenía, la cual ha sido utilizada por muchos investigadores desde entonces.

Vochting en 1878 estudió la polaridad en la formación de nuevas yemas y raíces de yemas axilares en Salix en una cámara Bellgar de vidrio al vacío; las yemas brotaron de la parte superior y las raíces de la parte inferior terminal.

Rajo y Mann (1970) demostraron que la edad fisiológica del inóculo es un factor que ejerce influencia en la formación de órganos; para ello, utilizaron como inóculo hojas de Echeveria elegans, observando que las hojas jóvenes solo formaban raíces y las hojas maduras formaban solo yemas vegetativas.

Haberlandt en 1902 al publicar uno de sus trabajos introduce el concepto de "totipotencialidad" celular, pues decía que si las células vegetales son totipotentes sería posible modificar su ambiente y nutrición después de aislarlas para recapitular las secuencias del desarrollo que se presentan en plantas intactas.

Realizó los experimentos más importantes respecto al cultivo de tejidos, cultivando células del mesófilo de Tradescantia en un medio artificial, él no obtuvo división celular en sus cultivos, debido en parte al medio tan simple que utilizó y la selección como explante de células altamente diferenciadas. Fue el primero que empleó el concepto de callo para definir una masa amorfa de células (Haberlandt, 1902). En 1934 White demostró que era factible cultivar con éxito órganos vegetales, utilizando raíces de Lycopersicum esculentum.

Al determinarse la totipotencialidad de las células vegetales, se puede cultivar cualquier parte de la planta en medios de cultivo adecuados, de acuerdo con lo que demostró White (1934). El medio de cultivo tiene dos funciones principales:

- 1.- Proporcionar los nutrientes básicos para el crecimiento continuado de los explantes aislados y de los propágulos subsiguientes.
- 2.- Dirigir el crecimiento y desarrollo mediante el control hormonal (Murashige, 1978).

Hartman y Kester (1989) describieron un sistema factorial para establecer los requerimientos del medio de cultivo para plantas, con base en trabajos anteriormente realizados, se considera que la aplicación de reguladores de crecimiento (citocininas-auxinas) en distintas concentraciones para la aplicación de tratamientos diversos con un número determinado de repeticiones puede darnos el tratamiento óptimo para los fines que la propagación in vitro persiga (obtención de brotes múltiples, formación de callo, enraizamiento, diferenciación celular, etc...).



El control hormonal se realiza según la clase de hormona ó regulador del crecimiento, su concentración en el medio y la secuencia con la que se proporcionen.

Diferentes especies pueden responder de modo distinto a las diversas citocininas y auxinas, en parte debido a su control hormonal natural. Una secuencia apropiada de hormonas es de particular importancia en cuanto a sus efectos inductores, debiendo estar ausente o en cantidades reducidas para que crezca el órgano.

El tener una mayor concentración de citocininas con respecto a auxinas causa la formación de brotes múltiples, cuando la proporción Auxina-Citocinina es relativamente alta, existe diferenciación de las células hacia primordios radicales (Rajo and Mann, 1970). En varias especies de árboles, el enraizamiento es una de las etapas más críticas en las técnicas de micropropagación (Standari and Fausto, 1990). En especies recalcitrantes al enraizamiento, ésto no se logra complementando el medio con diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento solamente, se utiliza Agrobacterium rhizogenes que es una bacteria que induce la formación de raíces en diversas especies vegetales. El enraizamiento se logra inoculando los brotes con Agrobacterium rhizogenes, los brotes deben tener una herida para que la bacteria pueda infectar a las células vegetales e introducir genes que induzcan la formación de raíces. Ya se ha logrado el enraizamiento en varias especies por ésta vía como en varias líneas de manzano (Lambert and Tepfer, 1991) y en Allocauarina verticillata, Lam (Phelep M. et al, 1991).

El citólogo Gautheret (1959) realizó un experimento para tener un crecimiento ilimitado de células homogéneas de cambium in vitro de Populus nigra y Salix capraea. Usó principalmente la solución de Knop como medio básico, además de glucosa, extracto de levadura y cisteína.

A partir de Gautheret que encontró el efecto del extracto de levadura sobre células cultivadas in vitro, muchos investigadores empezaron a buscar sustancias orgánicas que pudieran tener efecto morfogenético, como los aminoácidos y vitaminas, que desempeñan un papel importante en la organogénesis. El endospermo líquido del coco tiene cualidades nutricionales muy importantes. La combinación de 2,4-D con agua de coco, mostró un sorprendente efecto en la estimulación del crecimiento de tejidos cultivados de zanahoria y papa (Caplin and Steward, 1948).

Skog y Tsui (1948) sugirieron que la iniciación de brotes en segmentos de tallo de tabaco y la formación de callos podrían ser químicamente regulados por cambios en los medios de cultivo. Buscando el factor de la división celular, ellos lo encontraron al degradar preparaciones de ADN. Este compuesto fue aislado e identificado como 6-furfurilaminopurina y lo llamaron cinetina (Miller et al, 1955).

El cultivo de monocotiledóneas mostró ser más difícil que el de las dicotiledóneas. En la actualidad son muchas las especies que se ha logrado micropropagar, tanto de monocotiledóneas como dicotiledóneas aplicando las técnicas del cultivo de tejidos vegetales (Dodds and Roberts, 1983).

## 2.2. MICROPROPAGACION DE ESPECIES RELACIONADAS FILOGENETICAMENTE CON EL GUAYABILLO :

Broodrijk (1989) describió nuevos métodos de esterilización para el cultivo in vitro de guayaba Psidium guajava. Usó el segundo, tercero y cuarto segmento nodal de los puntos de crecimiento; fueron secados por cerca de una hora, después fueron puestos en etanol al 70% por un minuto y lavados con Yoduro de potasio por 5 segundos. Fueron esterilizados en nitrato de plata al 0.5% por 15 minutos, se enjuagaron los explantes con agua destilada estéril. Catorce días después los explantes fueron puestos en un medio (no especificado) donde el desarrollo de las hojas fue visible. El porcentaje de éxito fue de cerca del 70% con mínimo de encafecimiento.

Amin y Jaiswal (1988) trabajaron con explantes nodales de árboles de Psidium guajava crecidos en el campo con el propósito de lograr una propagación clonal rápida. Usaron medio basal de Murashige-Skoog suplementado con varias combinaciones y concentraciones de auxinas y citocininas. El mayor número de brotes/explante se obtuvieron en el medio MS suplementado con 1 mg/lit de benciladenina solamente. Cerca del 80% de brotes bien enraizados, los obtuvieron en un medio MS con ácido indolbutírico y ácido naftalenacético (0.2 mg/lit de cada uno). El carbón activado incrementó el porcentaje de enraizamiento y crecimiento de las plántulas. Las plántulas fueron exitosamente establecidas en suelo (Jaiswal and Amin, 1987).

Amin y Jaiswal (1987) usaron como explantes segmentos nodales de árboles maduros de Psidium guajava y los colocaron en

un medio Murashige-Skoog (MS) suplementado con 4.5  $\mu\text{M}$  (1.013 mg/lt) de benciladenina solo o en combinación con 0.6  $\mu\text{M}$  (0.105 mg/lt) ácido indolacético o 0.5  $\mu\text{M}$  (0.101 mg/lt) de ácido indolbutírico o 0.3  $\mu\text{M}$  (0.103 mg/lt) de GA3. Se indujeron brotes múltiples alargando las ramas axilares en un medio con 4.5  $\mu\text{M}$  de benciladenina (1.013 mg/lt) sin ninguna auxina y giberelina, se encontró que dió la más alta tasa de multiplicación. En este medio se desarrollaron de 3 a 6 brotes de explantes colectados de plantas del campo y produjo de 5 a 10 brotes de explantes tomados de brotes proliferados in vitro en 12 semanas de cultivo. Se separaron los brotes y se colocaron en un medio conteniendo una concentración más baja de benciladenina (0.5  $\mu\text{M}$ ) (0.112 mg/lt); este tratamiento incrementó el crecimiento en longitud y el número de brotes usados por cultivo. Raíces adventicias se obtuvieron en los brotes en un medio conteniendo la mitad de la concentración de las sales del medio Murashige-Skoog (MS), 1.5% de sacarosa, 1  $\mu\text{M}$  (0.2032 mg/lt) de ácido indolbutírico, 1  $\mu\text{M}$  (0.1862 mg/lt) de ácido naftalenacético y 1 gr/lt de carbón activado. Las plántulas regeneradas fueron exitosamente establecidas en el suelo.

Fitchet (1989) probó seis métodos para evitar el ennegrecimiento (oxidación) de los brotes que provocaba la muerte de éstos. El método más efectivo consistió en enjuagar los brotes, colocándolos después en cajas petri, poniéndolos a secar en una campana de flujo laminar por 30 a 45 minutos, hasta que ninguna de las superficies quedara húmeda. Una vez que estuvieron bien secas las superficies se incubaron. Este método contrarrestó el problema de oxidación de los brotes de Psidium quajava.

Babbar y Gupta (1986) cultivaron anteras en medio Murashige-Skoog (MS) y medio basal Nitsch (BM) o BM más  $10 \mu\text{M}$  (2.25 mg/lit) de benciladenina, se produjo callo con restringido crecimiento, acompañado por necrosis de tejidos, posiblemente como resultado de la acumulación de polifenoles. Para contrarrestar éste problema, ellos agregaron polivinilpirrolidona (PVP) que absorbe los polifenoles. Además de la presencia de PVP, un incremento en la concentración de sacarosa en el medio y un pretratamiento frío de las anteras, todos disminuyeron el porcentaje de encafecimiento, también retardaron la necrosis de callos; no fue posible mantener callos para diferenciación. El pretratamiento frío incrementó significativamente el porcentaje de callos a partir de anteras.

Loh y Rao (1989) usaron explantes de diferentes partes de plántulas que tenían poco tiempo de germinadas y segmentos nodales de plantas injertadas. Hubo regeneración en un 75 al 100% de brotes a partir de hipocotilos de semillas germinadas, brotes apicales y segmentos nodales cultivados en medio Murashige-Skoog (MS) con y sin benciladenina. El nivel óptimo de benciladenina BA para brotes apicales y segmentos nodales fue 0.1 mg/lit. Los segmentos nodales se utilizaron para la multiplicación de brotes; el promedio de brotes regenerados a partir de segmentos nodales fue de 3.2, se obtuvieron después de un periodo de 8 semanas en un medio con 0.5 mg/lit de BA; los brotes también fueron regenerados a partir de explantes de hojas. Los brotes regenerados fueron enraizados en medio basal con 100% de enraizamiento y más del 90% de las plántulas fueron establecidas

exitosamente en el suelo.

### 2.3. DESCRIPCION DEL GUAYABILLO :

2.3.1. Taxonomía : El guayabillo es una dicotiledónea, de la familia Myrtáceae, pertenece al género Psidium, especie sartorianum, descrita por Berg. y después revisada por Niedenzu.

#### 2.3.2. Descripción botánica del guayabillo :-

Penington y Sarukhan en 1968 hicieron la siguiente descripción acerca de Psidium sartorianum:

El árbol mide 15 m. de altura o más y d.a.p. (diámetro a la altura del pecho) hasta de 60 cm., tronco derecho con las ramas ascendentes y gruesas; copa angosta y densa. De corteza externa, escamosa, desprendiéndose en piezas lisas, delgadas y alargadas, pardo amarillenta con manchas grisáceas, quebradiza; grosor total de la corteza de 3 a 4 mm. De madera albura color crema amarillento, con bandas oscuras de parénquima paratraqueal, las ramas son pubescentes cuando jóvenes y glabras con la edad.

Yemas hasta de 0.5 mm., redondeadas cubiertas por escamas, morenas, glabras. Sin estípulas. Láminas foliares de 1.5 x 0.7 a 6.5 x 2.3 cm., lanceoladas o elípticas, con el margen entero ápice agudo con un acumen largo, base aguda a redondeada; verde amarillentas y brillantes en el haz, verde pálidas en el envés, glabras en ambas superficies; láminas con numerosas glándulas transparentes; peciolo de 1 a 4 mm., glabros. Los árboles de esta especie cambian todas sus hojas entre abril y mayo.

Flores solitarias o en pequeñas cimas axilares hasta de 2 cm. de largo; sobre pedúnculos de 10 a 15 mm., pubescentes,

perfumadas, actinomórficas, de 12 a 15 mm. de diámetro; cáliz cupular de 3 mm. de largo cerrado en botón, abriéndose irregularmente, densamente glandular en ambas superficies; pétalos blancos, 5, de 3 a 3.5 mm. de largo, insertos en el cuello del tubo del cáliz; estambres numerosos, de 5 a 6 mm. de largo, insertos en el tubo del cáliz, por abajo de los pétalos; ovario infero, 2 o 3-locular, con numerosos óvulos; estilo grueso, igualando en largo a los estambres, pubescentes; estigma capitado. Florece de mayo a septiembre.

Frutos : Bayas de 2 a 2.5 cm. de diámetro, globosas, con el cáliz frecuentemente persistente, amarillas y glabras, con el mesocarpio pulposo y amarillento, con sabor a guayaba; contienen alrededor de 5 semillas angulosas, de 5 a 7 mm. de largo, muy duras, amarillentas. Maduran de septiembre a febrero.

#### 2.3.3. Nombres comunes de la especie :-

Penington y Sarukhan (1968) reportaron los siguientes nombres comunes para Psidium sartorianum:

Guayabillo (Gro., Oax., Chis., Yuc.).

Arrayán (Sin., Ver., Oax., Dgo., Jal.).

Pichiché (Yuc.).

Rayana (Oax.).

#### 2.3.4. Ecología y distribución :

Se encuentra en la vertiente del Golfo desde el norte de Chiapas y sur de Tabasco a la península de Yucatán y en la vertiente del Pacífico desde Sinaloa hasta Chiapas, incluyendo la cuenca del Río Balsas. Es localmente abundante en el estrato

medio de selvas medianas subperennifolias y subcaducifolias principalmente de Brosimum alicastrum en suelos arcillosos derivados de materiales calizos o bien en suelos muy arenosos derivados de materiales ígneos o metamórficos, casi siempre cerca del nivel del mar (figura 2.1).

#### 2.3.5. Usos :

Su madera es usada para la construcción. Su fruto es comestible, se emplea en la preparación de aguas frescas, paletas, dulces, etc.. sus hojas tienen propiedades medicinales (Penington y Sarukhan, 1968).



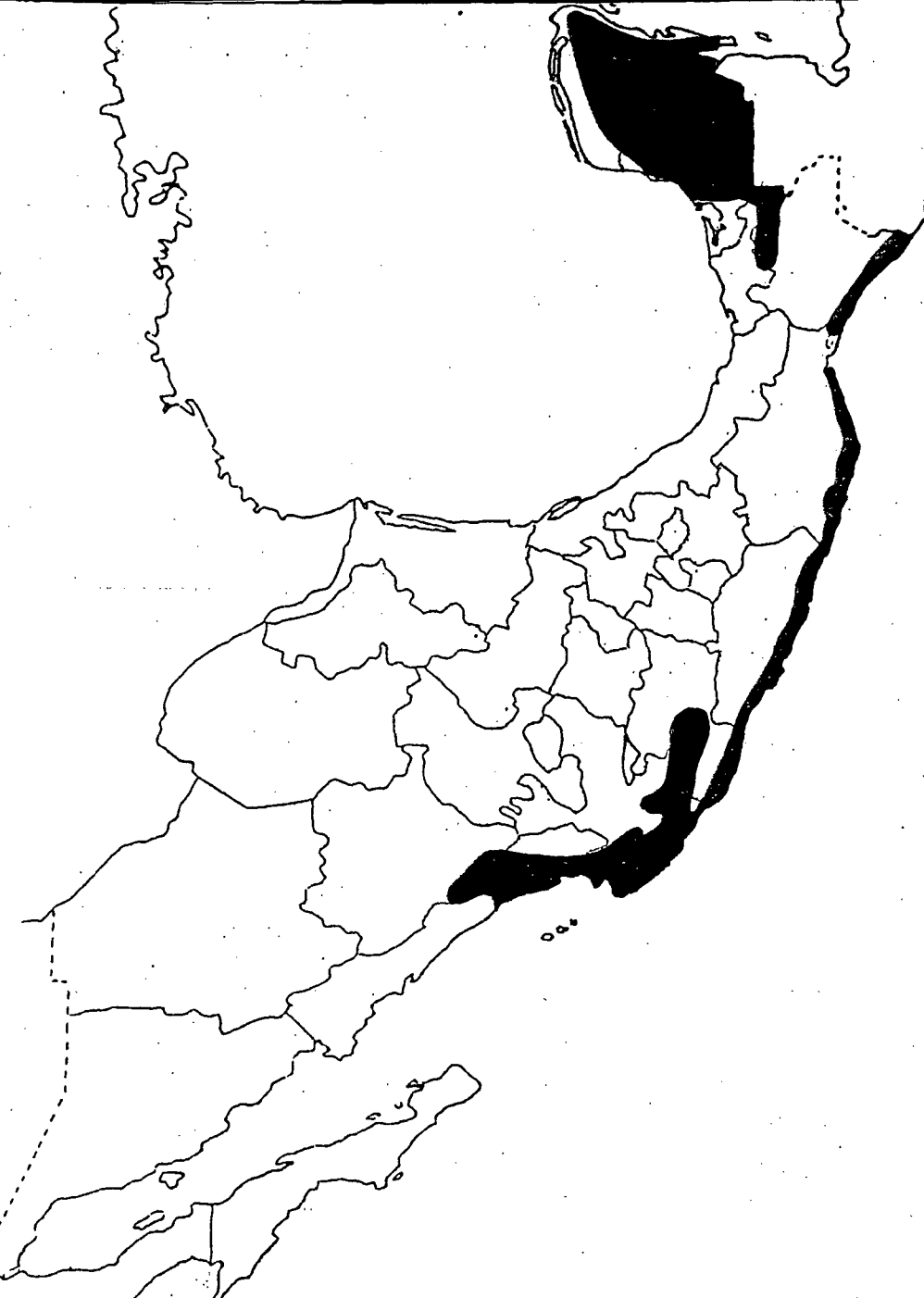


Figura 2.1. Distribución geográfica del guayabillo Psidium sartorianum en México.

### III. HIPOTESIS

Existen combinaciones específicas de ácido indolacético (AIA) y benciladenina (BA) que producen un número máximo de brotes y raíces en explantes de Psidium sartorianum.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1. OBJETIVO GENERAL :

- Establecer las condiciones de micropropagación para Psidium sartorianum (Berg.) Niedenzu.

### IV.2. OBJETIVOS PARTICULARES :

Establecer las concentraciones in vitro de auxinas y citocininas para la producción de brotes de Psidium sartorianum (Berg.) Niedenzu.

Establecer las concentraciones in vitro de auxinas y citocininas para la formación de raíces en Psidium sartorianum (Berg.) Niedenzu.

Establecimiento de las plántulas producidas in vitro a condiciones de invernadero.

## V. MATERIAL Y METODOS

Ver diagrama de flujo en la figura 5.1. que muestra la metodología que se siguió.

### V.1. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO ASEPTICO

#### OBTENCION DE MATERIAL BIOLÓGICO :

El material biológico que se utilizó fueron frutos de guayabillo Psidium satorianum (Berg.) Niedenzu, de los cuales se extrajeron las semillas. Los frutos se colectaron de plantas silvestres de Autlán Jal. y otros se compraron en mercados de Guadalajara Jal.

#### ESCARIFICACION, DESINFECCION Y SIEMBRA DEL MATERIAL BIOLÓGICO :

Las semillas extraídas de los frutos se escarificaron químicamente, con ácido sulfúrico concentrado, ya que las semillas tienen una testa muy gruesa y dura que hace retardar la germinación. Se escarificaron de la siguiente manera:

- 1.- Se colocaron las semillas en un recipiente de porcelana.
- 2.- Se vació con cuidado el ácido sulfúrico concentrado, hasta que las semillas quedaron bien cubiertas.
- 3.- Se agitaron las semillas lenta y cuidadosamente para que fueran atacadas por el ácido sulfúrico de manera uniforme.
- 4.- Se dejaron en reposo en el ácido sulfúrico por 15 minutos.
- 5.- Se colocaron las semillas en una malla de plástico.
- 6.- Se lavaron con detergente líquido (Dove) y se enjuagaron con agua corriente.

Una vez escarificadas se desinfectaron sumergiendo sucesivamente las semillas en :

- 1.- Quince minutos en blanqueador comercial Cloralex diluido al 50% con agua destilada (3% de hipoclorito de sodio).
- 2.- Cinco minutos en alcohol etílico de 96°.
- 3.- Tres enjuagues con agua destilada estéril ( 5 minutos en cada vez ).
- 4.- Se colocaron las semillas en cajas petri estériles con papel absorbente para reducir el exceso de agua (Alvarez, 1988).

Todas éstas operaciones se hicieron bajo condiciones de asepsia. Para ésto, el trabajo se realizó en una campana de flujo laminar horizontal. Los instrumentos de siembra y corte se sumergieron en alcohol etílico de 96° y se flamearon antes de cualquier operación, ésto con la finalidad de eliminar los microorganismos presentes en los instrumentos, ya que su presencia es indeseable, puesto que su tiempo de multiplicación es más corto que el de las células vegetales, por lo que crecerían más rápidamente, agotando los nutrientes del medio sintético. Además, los microorganismos pueden liberar al medio algunos de sus productos del metabolismo que podrían ser tóxicos para el material biológico; la eliminación de microorganismos es un aspecto muy importante en cultivo de tejidos vegetales (Villalobos, 1985; Hughees, 1981).

Se sembraron cinco semillas en cada frasco de alimento infantil (Gerber) conteniendo 25 ml de medio básico Murashige-Skoog (1962) adicionado con las vitaminas L2 (Phillips and Collins, 1979) en una concentración de 1/10 de los componentes orgánicos e inorgánicos, solidificado con 8 gr/lit de agar, con un pH ajustado a  $5.8 \pm .05$ , esterilizado en un autoclave durante 15 minutos, a 120 °C y 15 libras de presión.

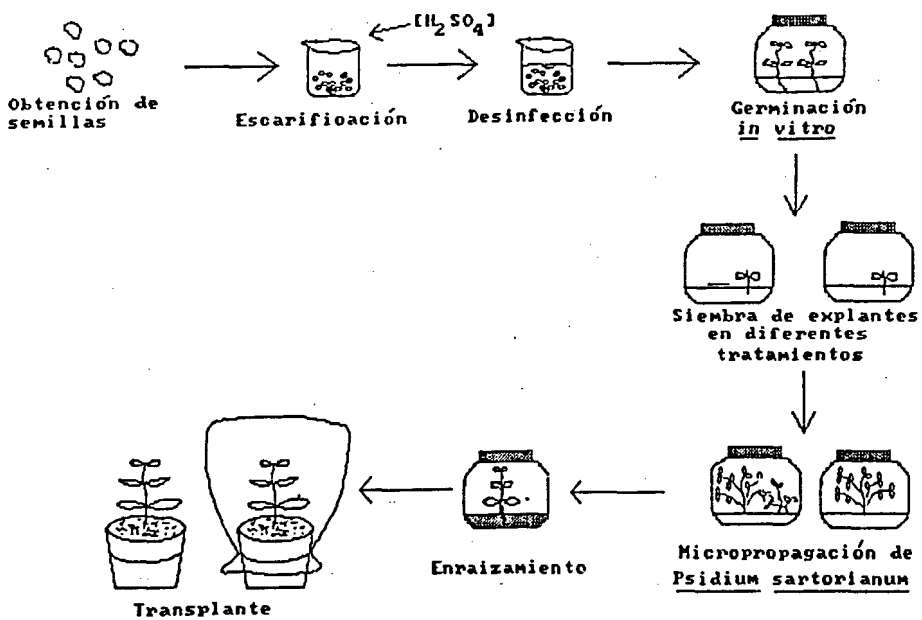


Figura 5.1. Diagrama de flujo del método que se utilizó para la micropropagación de *Psidium sartorianum*.

#### CONDICIONES AMBIENTALES DE INCUBACION :

Los frascos de cultivo se incubaron a una temperatura de  $28^{\circ}\text{C} \pm 2$  y con un fotoperiodo de 16 horas luz.

#### V.2. MULTIPLICACION

##### SELECCION DE EXPLANTES :

Después de que las semillas germinaron in vitro se seleccionaron las plántulas que alcanzaron una altura de 3 a 4 cm. De éstas plántulas se escogieron dos tipos de explantes, hipocotilo y yemas axilares de las hojas cotiledonares (fig. 5.2.). Los dos tipos de explantes se colocaron en un medio de cultivo Murashige-Skoog (MS) con diversas concentraciones de dos reguladores del crecimiento, para la formación de brotes múltiples, crecimiento apical, formación de raiz, etc.

##### CULTIVO DE LOS EXPLANTES :

Se utilizó medio de cultivo MS (Murashige-Skoog) con la adición de dos reguladores del crecimiento (ácido indolacético y benciladenina) para probar su efecto sobre el desarrollo de los brotes. Estos reguladores se mezclaron en diferentes concentraciones en el medio de cultivo. Fueron 25 tratamientos diferentes a los que se sometieron los explantes. Las resiembras se efectuaron cada 4 semanas a medio de cultivo fresco. El cuadro combinatorio de las concentraciones anteriores se muestra en la tabla 5.1.

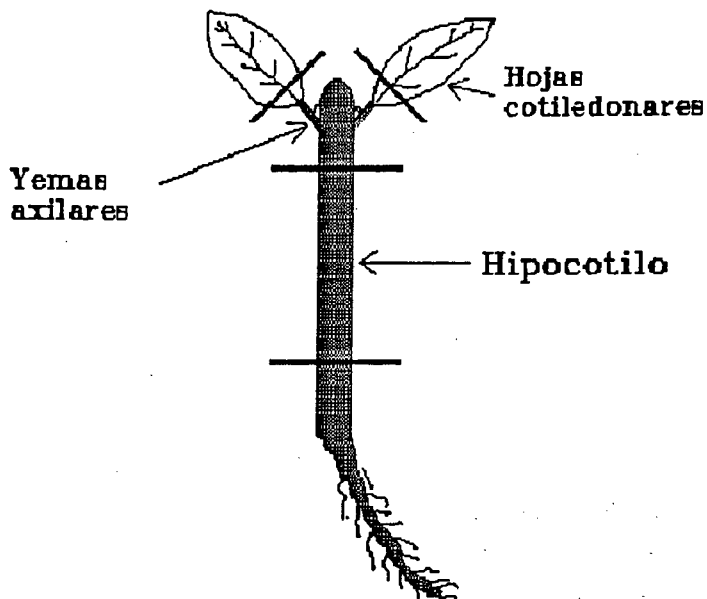


Figura 5.2. Cortes realizados en plántulas de Psidium sartorianum germinadas in vitro para seleccionar explantes para la micropropagación del guayabillo.



Benciladenina mg/lt

	0	1	2	3	4
A c.  I n d o l a c é t i c o	0 0/0 A	0/1 F	0/2 K	0/3 P	0/4 U
	0.5 0.5/0 B	0.5/1 G	0.5/2 L	0.5/3 Q	0.5/4 V
	1 1/0 C	1/1 H	1/2 M	1/3 R	1/4 W
	1.5 1.5/0 D	1.5/1 I	1.5/2 N	1.5/3 S	1.5/4 X
	2 2/0 E	2/1 J	2/2 O	2/3 T	2/4 Y

mg/lt

Tabla 5.1.

Combinaciones de auxina (ácido indolacético) y citocinina (benciladenina) para la micropropagación de Psidium sartorianum.

De dichas combinaciones de reguladores del crecimiento, se seleccionó el tratamiento que indujo la producción de mayor número de brotes.

### V.3. DESERVACION Y TOMA DE DATOS

Se tomaron datos cada mes de explantes de hipocotilo y yemas axilares de las hojas cotiledonares, las variables que se consideraron fueron :

- Número de brotes/explante.
- Longitud de brotes/expante.
- Número de raices/explante.
- Longitud de raices/explante.

### V.4. ANALISIS DE RESULTADOS

El analisis estadístico se realizó con datos tomados a los 4 y 7 meses de edad.

Se analizaron los resultados utilizando el Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías con efectos fijos para probar la hipótesis nula.

Las respuestas medias fueron comparadas utilizando la técnica T' de Tukey (Sokal and Rohlf, 1981) evaluándose los intervalos de diferencia mínima significativa (LSD) con  $\alpha = 0.05$ , los cuales se presentaron en forma gráfica.

Se utilizó como método de optimización un ajuste por regresión múltiple y una generación de superficies de respuesta (Sokal and Rohlf, 1981; Draper and Smith, 1978).

## V.5. ENRAIZAMIENTO

Los brotes propagados in vitro se sometieron a diferentes tratamientos para enraizar (tabla 5.2.) con la adición de diferentes concentraciones de auxina (ácido indolacético) y citocinina (benciladenina), 8 gr/lit de agar y 3 gr/lit de carbón activado. Las concentraciones usadas de AIA y BA más carbón activado de la tabla 5.2. para lograr el enraizamiento de brotes de Psidium sartorianum se determinó al probar el efecto de las concentraciones de los dos reguladores (AIA y BA) del tratamiento óptimo teórico para la producción de brotes múltiples, pero por estarse oxidando los brotes se agregó al medio de cultivo carbón activado para evitar éste problema; el carbón activado estimuló la formación de raíces en los brotes a diferencia de aquellos puestos en los mismos tratamientos con las mismas concentraciones de reguladores pero sin carbón activado que sólo produjeron brotes.

Tabla 5.2. Tratamientos para el enraizamiento de brotes de Psidium sartorianum usando ácido indolacético (AIA) y benciladenina (BA) en medio basal Murashige-Skoog (MS).

tratamiento	AIA mg/lt	BA mg/lt	Carbón activado mg/lt
T 1	4	2	3
T 2	4	2	0
T 3	3	3	3
T 4	3	3	0
T 5	3	4	3
T 6	3	4	0
T 7	4	4	3
T 8	4	4	0

Se probó el efecto del ácido indolbutírico (AIB) y el ácido naftalenacético (ANA) agregando 0.2 mg/lt de cada una de éstas auxinas al medio de cultivo con la mitad de las sales del medio Murashige-Skoog (Tabla 5.3) según Amin y Jaiswal (1987).

Tabla 5.3. Efecto del ácido naftalenacético y ácido indolbutírico para la producción de raíces en brotes de Psidium sartorianum con la mitad de las sales del medio Murashige-Skoog.

Tratamiento	AIB mg/lt	ANA mg/lt	Carbón activado mg/lt	medio basal
T 1A	0.2	0.2	3	0.5 de MS
T 2A	0.2	0.2	0	0.5 de MS

Se diseñó un nuevo experimento para enraizar brotes de Psidium sartorianum evaluando el efecto de las sales del medio Schenk-Hildebrandt modificado por Walker y Sato (1981), añadiendo dos auxinas (AIA y BA) más hemisulfato de adenina (Tabla 5.4.).

Tabla 5.4. Tratamientos para evaluar el efecto de las sales del medio SH (Schenk-Hilderandt modificado por Walker y Sato, 1981) en la formación de raíces en Psidium sartorianum.

Tratamiento	Medio basal	Carbón activado mg/lt	AIA mg/lt	BA mg/lt	Hemisulfato de adenina mg/lt
T 1B	SH	3	-	-	-
T 2B	SH	3	4	4	-
T 3B	SH	3	4	4	80

En muchas especies, uno de los problemas de la micropropagación es el enraizamiento, Psidium sartorianum es una especie con éste problema, para éste objetivo se inocularon los brotes con Agrobacterium rhizogenes, y se sembraron en medio MS con AIB y ANA (0.2 mg/lt de cada auxina). Se agregaron antibióticos al medio mencionado como la kanamicina y cefotaxima para evitar la contaminación en los medios de cultivo por A. rhizogenes (Tabla 5.5.) (Phelep et al, 1991; Lambert and Tepfer, 1991).

Por último, se inocularon los brotes de Psidium sartorianum con A. rhizogenes colocándolos en medio MS sólo o

con 4 mg/lt de AIA y BA más 6 gr/lt de agar. Transcurridos 5 días se resebraron en los mismos medios con 8 gr/lt de agar.

Tabla 5.5. Tratamientos para enraizar brotes de Psidium sartorianum por acción de A. rhizogenes con antibióticos para evitar la contaminación por la bacteria.

Tratamiento	AIB mg/lt	ANA mg/lt	Cefotaxima mg/lt	Kanamicina mg/lt	medio de cultivo
T 1C	0.2	0.2	500	50	MS
T 2C	0	0	500	50	MS

#### V.6. TRANSPLANTE

Para que las plántulas micropropagadas se adaptaran a las condiciones del medio ambiente se procedió de la siguiente manera:

1.- Las plántulas se retiraron de los frascos de cultivo. Se lavaron las raíces cuidadosamente con agua corriente (de la llave) para eliminar los residuos del medio de cultivo y evitar la infección por hongos y bacterias.

2.- Una vez lavado el sistema radicular se colocó la planta en un vaso de unicel con una mezcla de tierra y Sphagnum en una proporción de 1:1. Se regaron con agua de la llave.

3.- Los vasos se taparon con bolsas de plástico blancas transparentes y ligas elásticas para conservar del 80 al 100 % la humedad.

4.- Se fue disminuyendo la humedad poco a poco, perforando las bolsas después de una semana.

5.- Al término de 25 días se retiraron completamente las bolsas de los vasos de unicel. De ésta manera las plántulas se fueron enfrentando a las diversas condiciones del medio ambiente (figura 5.3.).



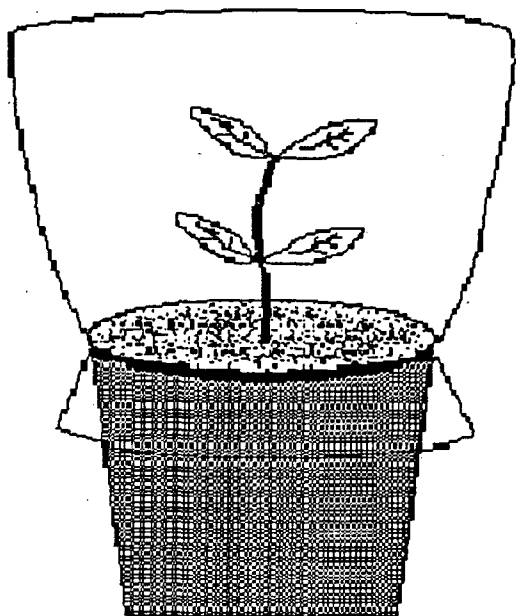


Figura 5.3. Aclimatación de las plántulas de Psidium sartorianum obtenidas in vitro a condiciones del medio ambiente.

## VI. RESULTADOS

### VI.1. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO ASEPTICO

ESCARIFICACION, DESINFECCION Y SIEMBRA DEL MATERIAL BIOLÓGICO :

ESCARIFICACION :

El porcentaje de semillas germinadas después del tratamiento de escarificación fue del 70 %, el tiempo de germinación fue muy variable oscilando entre los 12 a 28 días.

DESINFECCION :

A partir de las pruebas de desinfección realizadas con semillas de guayabillo Psidium sartorianum, se encontró que la mejor manera de tratarlas para su germinación in vitro es utilizando blanqueador comercial (Cloralex) diluido al 50 % durante 15 minutos, después de una inmersión de 5 minutos en alcohol etílico de 96° y tres enjuagues en agua destilada estéril.

La contaminación que se registró con éste tratamiento de desinfección fue siempre menor del 3 %.

### VI.2. MULTIPLICACION

SELECCION DE LOS EXPLANTES :

De los dos tipos de explantes utilizados inicialmente (hipocotilo y yemas axilares de las hojas cotiledonares) sólo hubo respuesta (generación de brotes múltiples) en yemas

laterales de las hojas cotiledonares, en el caso de los hipocotilos no se observó ninguna respuesta.

A partir de éste hecho se decidió utilizar solamente yemas laterales de las hojas cotiledonares para los experimentos de producción de brotes múltiples bajo distintas concentraciones de reguladores del crecimiento.

#### CULTIVO DE LOS EXPLANTES :

Al término de 4 meses, se realizó una primera evaluación de los resultados de los distintos tratamientos con reguladores del crecimiento. A los siete meses de cultivo se evaluó la respuesta de los brotes al efecto del AIA y BA. El ANOVA de los 25 tratamientos muestra que al menos alguno de los tratamientos difiere de manera significativa de los demás ( $p < 0.001$ ) el cual fue detectado mediante comparaciones múltiples, correspondiendo al tratamiento "S" de la tabla 5.1. que contiene 1.5 mg/l de ácido indolacético y 3 mg/l de benciladenina (tabla 6.1.).

Tabla 6.1. Resumen del ANOVA para la producción de brotes múltiples en *Psidium sartorianum* en 25 tratamientos (con diferentes combinaciones de AIA y BA).

Fuente de Variación	Suma de cuad.	G.L.	C. M.	F	Prob
Total (Corregido)	1134.151	123			
Tratamientos	448.464	24	18.686	2.70	<0.001
Error	685.687	99	6.926		

El promedio de brotes por explante para el tratamiento "S" fue de 6.6. La gráfica de las medias de los tratamientos y de los intervalos de diferencia mínima significativa para 95% se muestra en la figura 6.1.

Con un análisis posterior (ANOVA bifactorial) fue posible evaluar los efectos de la adición de cada uno de los dos reguladores utilizados y la posible interacción entre ellos. La tabla 6.2. muestra los resultados del análisis, en donde puede observarse que el factor crítico para la producción de brotes es la concentración utilizada de benciladenina. Se observa además que no existe una interacción significativa entre factores.

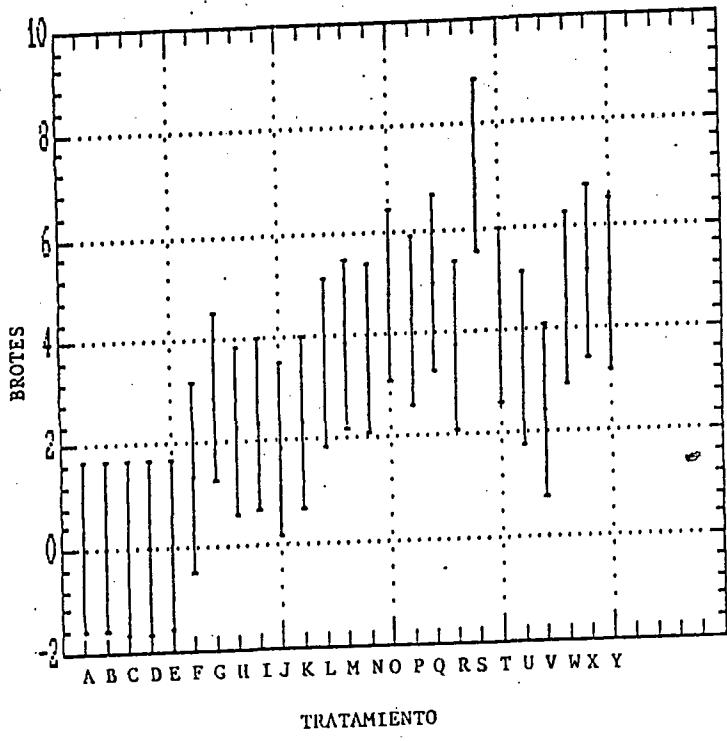


Figura 6.1. Gráfica de las medias de los tratamientos y los intervalos de diferencia mínima significativa para un nivel de 95 % de significancia.

Tabla 6.2. Resumen del ANOVA para la producción de brotes múltiples en Psidium sartorianum para los 2 factores (AIA y BA) después de 120 días de cultivo in vitro.

Fuente de Variación	Suma de cuad.	G.L.	C. M.	F	Prob
Efectos principales	391.356	8	48.919	7.063	<0.001
AIA	25.435	4	6.359	0.918	.457
BA	366.963	4	91.741	13.246	<0.001
Interacción	57.107	16	3.569	0.515	.934
Residual	685.687	99	6.926		
Total (Corregido)	1134.151	123			

Las gráficas de las medias y los intervalos de diferencia mínima significativa asociados para el ANOVA por factores, reiteran que la mayor producción de brotes ocurre en la concentración de reguladores antes descrita como tratamiento "S" con 3 mg/lit de benciladenina y 1.5 mg/lit de ácido indolacético (Figura 6.2. y figura 6.3.).

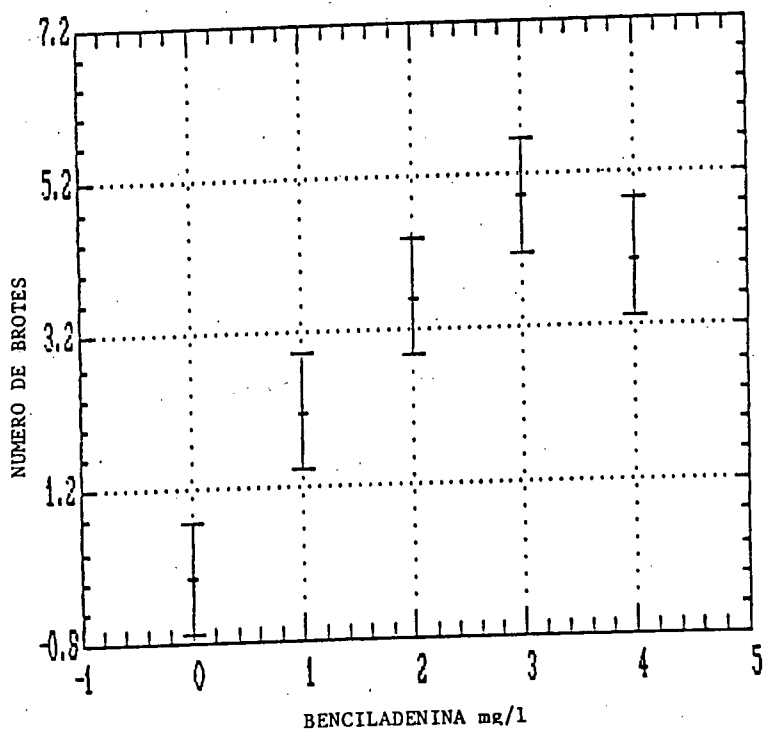


Figura 6.2. Intervalos de DMS para los niveles de benciladenina (BA) en la producción in vitro de brotes múltiples en Psidium sartorianum.

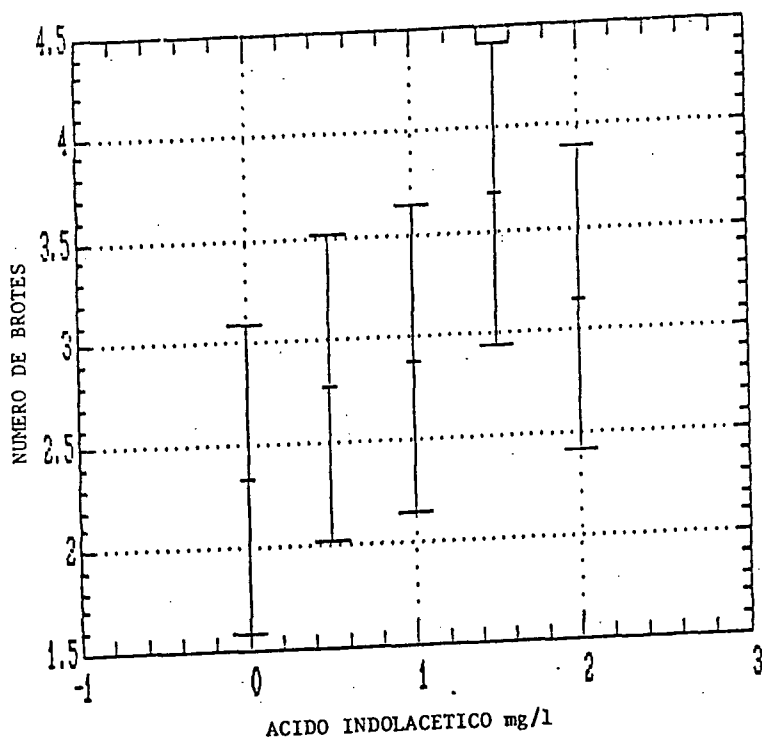


Figura 6.3. Intervalos de DMS para los niveles de ácido indolacético (AIA) en la producción in vitro de brotes múltiples en Psidium sartorianum.



El modelo polinomial de segundo orden con dos variables que se efectuó con el objeto de encontrar el punto óptimo para la producción de brotes mostró un ajuste significativo ( $p < 0.001$ ) lo cual permite su utilización para elaborar predicciones acerca de la producción de brotes. Los coeficientes del modelo y sus estadísticos así como la tabla de ANOVA para el modelo de regresión múltiple se muestran en las tablas 6.3. y 6.4.

Tabla 6.3. Resultados del ajuste del modelo polinomial de segundo orden para la producción de brotes múltiples en Psidium sartorianum.

VARIABLE	COEFICIENTE	ERROR ESTANDAR
IAA	0.315	0.816
BA	2.361	0.411
AIA <sup>2</sup>	-0.185	0.440
BA <sup>2</sup>	-0.391	0.111
IAA*BA	0.225	0.160

Tabla 6.4. Análisis de Varianza de la Regresión Múltiple.

Fuente de Variación	Suma de cuad.	G.L.	C. M.	F	Prob
Modelo	1330.352	5	266.070	55.49	<.001
Error	565.835	118	4.795		
Total	1896.187	123			

$$R^2 = 0.702$$

$$R^2 \text{ (ajustada)} = 0.692$$

$$\text{Error Estd.} = 2.190$$

A partir de los coeficientes del modelo empírico ajustado se generaron gráficas de superficie de respuesta y de contornos que se muestran en las figuras 6.4. y 6.5., en las cuales es posible apreciar los niveles o zonas en las cuales las concentraciones de los dos reguladores utilizados producen una mayor cantidad de brotes.

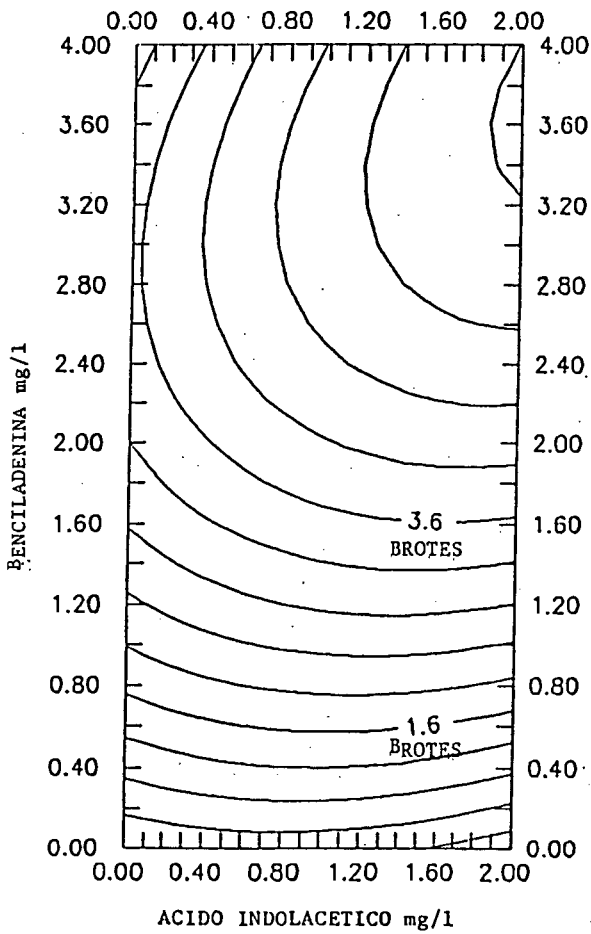


Figura 6.4. Diagrama de contornos para la producción de brotes múltiples en *Psidium sartorianum* según ajuste a un modelo polinomial de dos variables.

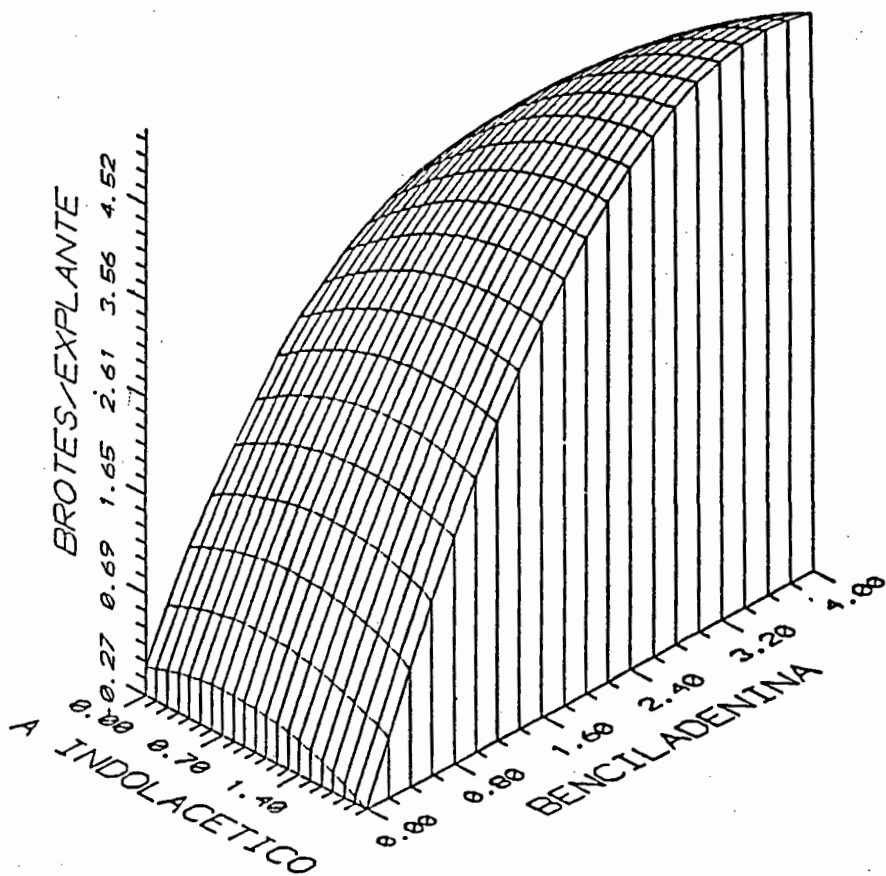


Figura 6.5.

Gráfica de superficie de respuesta para la producción de brotes múltiples en Psidium sartorianum según un ajuste a un modelo polinomial de dos variables.

Después de realizar el análisis estadístico del diseño experimental, se determinó la concentración óptima de auxina y citocinina para la mayor producción de brotes múltiples, el cual fue probado en nuevos diseños para evaluar ésta respuesta. Se encontró que la combinación óptima teórica es de 4 mg/lit de benciladenina y 4 mg/lit de ácido indolacético, se determinó mediante un análisis de puntos críticos (Draper and Smith, 1978). Su efecto no tuvo una diferencia significativa en la producción de brotes comparado con el tratamiento "S", con 3 mg/lit de benciladenina y 1.5 mg/lit de ácido indolacético; por lo que se optó por emplear éste tratamiento, para la micropropagación del guayabillo.

Durante la fase experimental se presentó la oxidación de los brotes provocando su muerte a partir de los tres meses de cultivo. Se colocaron los brotes en medio de cultivo con 3 mg/lit de carbón activado para evitar éste problema, pero no se observó un efecto benéfico del carbón sobre los brotes.

También se agitaron los brotes en matraces erlenmeyer con agua destilada estéril durante 2 horas en un agitador orbital a 200 rpm, para evaluar si agitándolos liberaban los fenoles, que son los responsables de la oxidación y cuando se sembraron de nuevo, se observó disminución en la producción de éstas sustancias y en la mortalidad de los brotes, pero al cabo de 8 días aproximadamente se empezaban a oxidar.

Este problema que no pudo ser controlado, ocasionó la muerte de aproximadamente el 40 % de los brotes existentes.

### VI.3. ENRAIZAMIENTO

El medio para el enraizamiento de plántulas propagadas in vitro fue el medio Murashige-Skoog (MS) suplementado con 4 mg/lit de benciladenina, 4 mg/lit de ácido indolacético, 8 gr/lit de agar para solidificar el medio de cultivo y 3 gr/lit de carbón activado que indujo 90 % de respuesta favorable en la formación de raíces, en base a resultados obtenidos con los diferentes tratamientos de la tabla 5.2. Este porcentaje fue disminuyendo considerablemente, con la edad de los cultivos. Algunas de las razones pudieron haber sido, que las plántulas procedían de lotes diferentes de semillas, también pudo deberse a que los brotes tenían una mayor edad fisiológica que los primeros que se lograron enraizar.

Más tarde se probó el efecto de 2 auxinas (ácido indolbutírico y ácido naftalenacético) 2 mg/lit de cada uno en medio de cultivo con la mitad de sales del medio Murashige-Skoog, 3 gr/lit de carbón activado y 8 gr/lit de agar. Este tratamiento estimuló la formación de raíces en un 4 %

En medio 0.5 MS y 3 gr/lit de carbón activado sólo el 4 % de los brotes enraizaron.

Todas las raíces que se originaron aparentemente no tenían una verdadera conexión con el tallo, ocasionando que las plántulas no sobrevivieran una vez que se transplantaron.

Al diseñar un nuevo experimento para enraizar brotes de Psidium sartorianum evaluando el efecto de las sales del medio SH Schenk-Hildebrandt modificado por Walker y Sato (1981) con

auxinas y carbón activado, se observó que las sales del medio SH incrementaron 20 % la oxidación de los brotes.

Al inocularse los brotes con la bacteria Agrobacterium rhizogenes para evaluar su acción, no se determinó la acción de la bacteria, porque murieron aproximadamente el 90 % de los brotes existentes por oxidación. La mortalidad de los brotes se debió a que los brotes de Psidium sartorianum no tienen tolerancia a la kanamicina y cefotaxima, por lo que antes se debieron de haber hecho pruebas de tolerancia a éstos antibióticos.

#### VI.4. TRANSPLANTE :

La supervivencia de las plántulas propagadas in vitro fue del 20 %. Solamente aquellas que tenían una altura de más de 2.5 cm pudieron establecerse, mientras que las que tenían una altura menor murieron (tabla 6.5.).

Tabla 6.5. Resultados de la adaptación de plántulas de Psidium sartorianum obtenidas in vitro a condiciones del medio ambiente.

Plántula	# de raíces	Longitud de la raíz cm	Altura del brote cm	SV.mes	----2 meses
1	1	1	3.5	Si	Si
2	1	1	2.5	No	No
3	1	0.5	2.5	Si	No
4	1	0.5	1.5	No	No
5	1	0.5	1.5	No	No
6	2	0.5	2.0	Si	No
		0.5			
7	2	0.5	2.5	Si	Si
		1.5			
8	1	2.5	2.5	Si	Si
9	1	0.5	2.0	Si	No
10	2	0.5	2.5	Si	No
		1.5			
11	1	2.5	3.0	Si	No
12	1	5.0	5.0	No	No
13	1	1.5	1.5	No	No
14	1	0.5	3.0	Si	Si
15	1	0.5	2.5	Si	No
16	1	1.0	1.5	Si	No
17	1	1.5	5.0	Si	No
18	1	1.5	2.0	Si	No
19	1	1.0	2.0	No	No

SV: supervivencia



## VII. DISCUSION

### VII.1. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO ASEPTICO

La fuente del explante es de gran importancia en la respuesta de las especies cultivadas in vitro. Los explantes juveniles responden más positivamente que los explantes maduros. Se utilizaron explantes juveniles de origen embrionario (hipocotilos y yemas apicales primarias) provenientes de semillas germinadas in vitro (Villalobos, 1985).

### VII.2. MULTIPLICACION

#### SELECCION DE EXPLANTES :

Las yemas laterales de las hojas cotiledonares fueron los únicos explantes que generaron brotes múltiples. En todas las especies existen yemas laterales en las axilas de las hojas, las cuales generalmente están inhibidas por la dominancia apical. Hay evidencias de que la dominancia apical depende de la fuente de citocininas endógenas (Phillips, 1975). Si uno de éstos ápices es cultivado en un medio de cultivo sin reguladores del crecimiento o únicamente auxinas, es muy probable que éste siga su crecimiento monopódico normal. En el caso de Psidium sartorianum aquellos tratamientos que tenían de 0 a 2 mg/lit de ácido indolacético no desarrollaron brotes, únicamente formaron raíces. Sin embargo si se agregan citocininas al medio, las yemas

laterales brotarán prematuramente del ápice, seguidas de brotaciones sucesivas (Villalobos et al, 1983; Mott, 1981). En este experimento los explantes de Psidium sartorianum generaron diferentes números de brotes/explante según la concentración de citocinina (benciladenina) y auxina (ácido indolacético).

#### CULTIVO DE LOS EXPLANTES :

La mayoría de los sistemas de cultivo in vitro de tejidos requieren de reguladores del crecimiento exógenos para favorecer el desarrollo de los explantes. No sólo el tipo y la concentración de un regulador del crecimiento, sino también la composición del medio basal influye ampliamente en el crecimiento y desarrollo de las plántulas in vitro (Von Arnold and Wallin, 1988).

Las diferentes plantas pueden responder de modo distinto a las diversas citocininas y auxinas, en parte debido a su control hormonal natural.

En el caso de Psidium sartorianum se observa que deben de existir ciertas concentraciones de ácido indolacético y benciladenina, tanto para la producción de brotes como formación de raíces en los explantes, a diferencia de otras especies que en la etapa de producción de brotes únicamente requiere de cierto tipo de citocinina y en la etapa de formación de raíces sólo intervienen auxinas.

La guayaba Psidium guajava aunque es una especie relacionada filogenéticamente con el guayabillo Psidium sartorianum tiene

requerimientos de reguladores del crecimiento muy diferentes. En la etapa de producción de brotes Jaiswal y Amin (1987), reportaron que con explantes de árboles maduros, para obtener mayor número de brotes/explante, utilizaron medio MS suplementado únicamente con 1 mg/lit de benciladenina y cerca del 80 % de los brotes fueron bien enraizados en medio MS con 0.2 mg/lit de cada una de las auxinas ácido indolbutírico y ácido naftalenacético.

En otras especies como Pinus radiata en la multiplicación de brotes, las auxinas no son necesarias y cuando se agregan al medio de cultivo, los tejidos pueden formar callos en vez de primordios (Villalobos et al, 1983).

Durante el cultivo de los explantes la producción de fenoles produjo su oxidación ocasionando el 40 % de muerte en los explantes, fenómeno que posiblemente sea propio del género Psidium por ser leñoso. Fitchet (1989) probó seis métodos para evitar el ennegrecimiento de los explantes de guayaba Psidium quajava.

### VII.3. ENRAIZAMIENTO :

La función del enraizamiento es preparar a la plántula para su plantación y establecimiento fuera del medio artificial del frasco de cultivo. Una característica en ésta etapa es el cambio a condiciones que favorecen la iniciación de las raíces y elongación del tallo (Hartmann and Kester, 1987).

En varias especies de árboles, el enraizamiento es uno de los pasos más críticos en las técnicas de micropropagación (Standardi and Fausto, 1990).

En ésta etapa es importante el efecto del carbón activado, ya que incrementa el porcentaje de enraizamiento, al absorber excesos de reguladores del crecimiento, sustancias inhibitorias y nutrientes, esto induce formación de raíces en los explantes por estar sometidos a un estrés de nutrientes y reguladores del crecimiento. El color negro que le confiere al medio es otro factor estimulador del sistema radicular. Además tiene efectos positivos en la elongación de los brotes (Jaiswal and Amin, 1987; Standardi and Fausto, 1990; Villalobos, 1985). El efecto del carbón activado se observó en los diferentes tratamientos de la tabla 5.2. ya que únicamente los tratamientos que contenían el carbón incrementaron ésta respuesta morfogénica (formación de raíces) y la elongación de los brotes de Psidium sartorianum. El tratamiento T 8 contenía 4 mg/lt de benciladenina y de ácido indolacético, el tratamiento T 7 además tenía 3 mg/lt de carbón activado, que incrementó la diferenciación de raíces en comparación con el T 8.

En otras especies se ha logrado el enraizamiento inoculando los brotes con Agrobacterium rhizogenes. Lambert y Tepfer (1991) indujeron raíces en diferentes líneas de manzano, cortando tallos e inoculándolos con ésta bacteria, obtuvieron plantas quiméricas con raíces transformadas y brotes normales. Mostraron que la manopina, cuya síntesis es codificada por el Ri T-DNA es producida en raíces y transportada a las partes aéreas. A. rhizogenes puede ser empleada para propagar genotipos de manzanas recalcitrantes, creando plantas quiméricas, que contienen productos y genes extraños en partes aéreas, sin tener físicamente genes extraños en los frutos. Sólo un gene del Ri T-DNA es suficiente para producir la inducción de raíces en manzana. Ellos sugieren que éste gene puede ser permanentemente insertado dentro del genoma de raíces para lograr el enraizamiento.

Phelep et al, (1991) inocularon diferentes órganos (hipocotilos, epicotilos y cotiledones) de Allocasuarina verticillata Lam. con dos cepas de A. rhizogenes (2659 y A4). 30 % de los cotiledones inoculados con la cepa A4 y 50 % de los hipocotilos inoculados con la cepa 2659 formaron raíces. Raíces transformadas por la cepa 2659 tuvieron un fenotipo de raíces peludas y regeneraron brotes espontáneamente. Las raíces originadas en el sitio de la inoculación se colocaron en medio BM (formado con los minerales del medio Murashige-Skoog y las vitaminas del medio de Nitsch y Nitsch), suplementado con 20 gr/lit de sacarosa, solidificado con 3.5 de gelrite, además 0.5

gr/lt de Carbencillin durante el primer subcultivo, para eliminar la bacteria y evitar contaminación en los medios de cultivo. Se regeneraron brotes de raíces inducidas por A4 en medio MH, conformado por el medio BM suplementado con 0.25 mg/lt de ácido naftalenacético (ANA), 0.1 mg/lt de bencilaminopurina (BAP), además se usaron intercaladamente dos fuentes de carbono, 60 gr/lt de maltosa y 20 gr/lt de sacarosa. Los brotes se separaron para el enraizamiento colocándolos en medio RM, conformado por el medio BM solidificado con 3.5 gr/lt de gelrite, 20 gr/lt de sacarosa y 0.1 mg/lt de ácido indolbutírico (IBA). A. rhizogenes no formó raíces en Psidium sartorianum.

#### VII.4. TRANSPLANTE :

Las plantas que crecen en un medio de cultivo artificial altamente protegido tienen ciertas características como sensibilidad a la escasez de humedad, por lo que deben de tener periodos de aclimatación gradual con decrecimiento de humedad para lograr su supervivencia. Son esenciales algunas condiciones ambientales como el de ir aumentando gradualmente la intensidad de la luz. Para ésto se colocaron inicialmente en un lugar sombreado. Otro requerimiento es proporcionar a las plantas un medio de suelo aerado y bien drenado, que permita que las raíces se desarrollen con rapidez (Hartmann and Kester, 1989).

Las plantas extraídas de los cultivos in vitro son muy sensibles al marchitamiento, desecación e infección (Von Arnold and Wallin, 1988).

## VIII. CONCLUSIONES

- Los explantes que tuvieron mejor respuesta a la formación de brotes múltiples son las yemas axilares de las hojas cotiledonares de plántulas germinadas in vitro.
- La concentración recomendada a partir de éste trabajo de reguladores del crecimiento para la producción de brotes múltiples in vitro de Psidium sartorianum es 3 mg/lt de benciladenina (BA) y 1.5 mg/lt de ácido indolacético (AIA) en medio basal Murashige-Skoog con vitaminas L2.
- La concentración de reguladores del crecimiento para la formación de raíces in vitro en brotes de Psidium sartorianum es 4 mg/lt de benciladenina (BA), 4 mg/lt de ácido indolacético (AIA) y 3 gr/lt de carbón activado en medio de cultivo Murashige-Skoog (MS). Este tratamiento fue el mejor para lograr el enraizamiento aunque el porcentaje disminuyó considerablemente al aumentar la edad fisiológica de los explantes.
- Las plántulas de Psidium sartorianum obtenidas in vitro requieren dos condiciones para adaptarse al medio ambiente, disminución gradual de humedad y un aumento progresivo en la intensidad luminosa. Sólo las plántulas con una altura mayor de 2.5 cm pudieron aclimatarse exitosamente.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- Alvarez A.B. 1988. Reguladores del crecimiento vegetal. En: Hurtado, D.V. y M.M. Merino (eds). Cultivo de tejidos vegetales. Trillas. México, D.F. 48-66.
- Amin, M.N. and V.S. Jaiswal. 1987. Rapid clonal propagation of guava through in vitro shoot proliferation on nodal explants of mature trees. *Plant Cell, Tiss and Org Cult.* 9 (3): 235-243.
- Amin, M.N. V.S. and Jaiswal. 1988. Micropropagation as an aid to rapid cloning of a guava cultivar. *Sci. Hort.* 36 (2) :89-95.
- Auge, R. G., J. Beauchesne; L. Boccon-Gibod; B. Decourtys; R. Digat; J. Minier; C. Marand; Y. Oudin and H. Vidalie. 1982. La culture In vitro et ses applications horticoles. *Technique et Documentatation (Lavoisier)*. J. B. Bailliere. 11-15.
- Babbar, S.B. S.C. Gupta. 1986. Induction of androgenesis and callus formation in In vitro cultured anthers of a myrtaceous fruit tree (Psidium guajava L.) *Bot. Magazine.* 99 (1053) :75-83.
- Bidwell, R. G. S. 1983. *Fisiología Vegetal*. Kingston, Ontario Canadá; Agt Editor S. A.
- Broodriijk, M. 1989. New sterilization method for the In vitro culture of guaves (Psidium guajava). *Inutingsbulletin-Navorsingsinstituut vir Citrus en Subtropiese Vrogte.* (No.202): 1-2.
- Calderón, A. E. 1985. *Fruticultura General*. Ed Limusa. Tercera edición. México.
- Caplin, S.M. and F.C. Steward. 1948. Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. *Science* 108: 655-657.



- Dodds J.H. and L.W. Roberts. 1983. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press. pp 1-9.
- Draper, N. R., and H. Smith. 1981. Applied Regression Analysis. 2nd. Ed. Wiley New York.
- Fitchet, M. 1989. Tissue culture of guava. Bulletin Citrus and Subtropical Fruit Research Institute. 201: 4-5.
- Gautheret, R.J. 1959. La culture des tissus végétaux, techniques et réalisations. Paris: Masson & Cie.
- Haberlandt, G. 1902. Kuitinversuche mit isolierten pflanzeller Sber. Acad. Wiss Wien. III: 69-92. En Plant tissue and cell culture, Street, H.E., Second edition, Academic Press., U.S.A., 1-10.
- Hartmann, H.T.; D. E. Kester. 1989. Propagación de plantas. CECSA. pp. 593-618.
- Hughees, K. W. 1981. Ornamental species. B. V. Conger, ed. cloning agricultural plants via In vitro techniques. Boca Raton, Florida C.R.C. Press pp 5-50
- Jaiswal, V.S. and M.N. Amin. 1987. In vitro propagation of guava from shoot cultures of mature trees. Plant Physiol. 130 (1) :7-12.
- Lambert C.; D. Thepfer. 1991. Use of Agrobacterium rhizógenes to create chimeric apple trees through genetic grafting. Biotech. 9: 80-83.
- Loh, C.S.; A.N. Rao. 1989. Clonal propagation of guava (Psidium quajava L.) from seedlings and grafted plants and adventitious shoot formation In vitro. Sci. Hort. 39 (1): 31-39.
- Merino M. M. E. 1988. Consideraciones generales que deben tomarse en la planeación de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.. En: Hurtado, D. V. y M. M. Merino (eds). Cultivo de tejidos vegetales. Trillas. México. pp 35-43.

- Miller, C.O., Skoog, F., Saltza-M., Strong, F.M. 1955. Kinetin a cell division factor from desoxyribonucleic acid. J. Am. Chem. Soc. 77, 1329.
- Mott, R.L. 1981. Trees. In: Cloning Agricultural Plants via in vitro. Techniques. B. V. Conger Ed. CRC Press. 217-154.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol.Plant. 15: 473-497.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 25. pag 135-166.
- Murashige, T. 1978. Principles of rapid propagation In propagation of higher plants through tissue culture, K.M. Hughes, R. Henke, and M. Constantin, eds. U.S. dept. of Energy, Tech. information Center. 14-24.
- Penington, T. D.; J. Sarukhan. 1968. Arboles tropicales de México. Instituto Nacional de investigacione forestales. Secretaria de Agricultura y Ganaderia. México. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Phelep. M.; A. Petit; L. Martín; E. Duhoux and J. Tempé. 1991. Transformation and regeneration of a Nitrogen-Fixing tree, Allochuarina verticillata Lam. Biotech. 9:461- 466.
- Phillips, I. D. J. 1975. Apical dominance. Ann. Rev. Plant Physiol. 26: 341-367.
- Phillips, G. C. and G. B. Collins. 1979. In vitro tissue cultures of selected legumes and plant regenerarion from callus cultures of red clover. Crop Sci. 19: 59-64.
- Quintero, R. A. 1984. El cultivo de células vegetales y su aplicación a la producción de compuestos con actividad fisiológica. Revista de la Sociedad Química de México. ed. Ulaia. M.e 28 (3). pag 114-118.

- Quintero, R. R. 1985. *Prospectivas de la Biotecnología en México*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México, D.F.
- Rajo, M.V.S., H.E. Mann. 1970. Regenerative studies in the detached leaves of Echeveria elegans: Anatomy and regeneration of leaves in sterile culture. *Can. J.Bot.*, 48: 1887-1891.
- Robert, L. M. and Loyola, V. M. 1985. El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. En: Robert, L.M. ; V.M. Loyola. El cultivo de Tejidos Vegetales en México. CONACYT. pp. 21-26.
- Rubluo, I. A. 1990. Micropropagación. Boletín de CIATEJ. vol 3(11):15-18.
- Skoog, F., C. Tsui. 1948. Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultures In vitro. *Am. J. Bot.* 35, 782-7.
- Sokal, R.R and F.J. Rohlf. 1981. *Biometry* 2nd. Ed. W. H. Freeman and Co. S.F. USA.
- Soler, R. 1974. *Fruticultura moderna*. Ed. Albatros. Argentina.
- Standardi Alvaro; R. Fausto. 1990. Effects of Some Antioxidants on in vitro Rooting of Apple shoots. *HortScience*. 25(11) : 1435-1436.
- Street, H.E. 1977. *Plant tissue and cell culture*, 2nd. Ed. Academic Press., U.S.A., 1-10.
- Villalobos, V. M.; Thorpe, A. T. and Yeung, E. C. 1983. Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en especies vegetales. *Ciencia y Tecnología*. 51: 43-59.
- Villalobos, A. V. M. 1985. Micropropagación de especies forestales. Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Centro de Genética, Colegio de Postgraduados, Chapingo. pp 2-12.
- Villalobos, A. V. M. 1985. *Fundamentos teórico prácticos de cultivo de tejidos vegetales*; Centro de Genética, Colegio de Postgraduados Montecillos, México. Primer Curso FAO-Mex de

Micropropagación Vegetal. pag 79-88.

Villalobos, A.; V. M.; E. C. Yeung and T. A. Thorpe. 1985. Promeristemoids as an early differentiation step of Shoot in Radiata Pine. Can. J. of Botany.

Von Arnold and Wallin. 1988. Tissue culture methods for clonal propagation of forest trees. I.A.P.T.C. Newsletter. 56: 2-13.

Walker K. A. and S. J. Sato. 1981. Morphogenesis in callus tissue of Medicago sativa: the role of ammonium ion in somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 1: 110-122.

White, P.R. 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in liquid medium. Plant Physiol. 9: 585-600.