

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE PROPAGACIÓN *IN VITRO* EN
“GUAYABO DEL PAÍS”
(*Acca sellowiana* (Berg.) Burret.)**

por

María Inés VANZINI PINO

**TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Ingeniero Agrónomo.**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2016**

Tesis aprobada por:

Director:

Ing. Agr. MSc. Silvia Ross

.....

Ing. Agr. MSc. Danilo Cabrera

.....

Ing. Agr. MSc. José Gándara

Fecha: 13 de octubre de 2016

Autor:

María Inés Vanzini

AGRADECIMIENTOS

A la Ing. Agr. Silvia Ross (MSc.) por todo su apoyo, su valiosa colaboración y su paciencia en esta tesis como directora y supervisora de este trabajo. A los cotutores Ing. Agr. José Gándara (MSc.), Ing. Agr. Danilo Cabrera (Msc.), y Lic. Sully Toledo por sus valiosas correcciones y su buena disposición y consejos. A la Ing. Agr. Evelyn Pechi por ayudarme en las tareas prácticas de laboratorio. A mi familia y amigos por darme su apoyo sostenido durante toda la carrera.

Un especial reconocimiento a mi querida amiga Andrea Logiuratto, compañera a lo largo de toda la carrera y de la tesis, quién a causa de su enfermedad no pudo culminar este trabajo, pero a pesar de ello, dejó un aporte invaluable en los trabajos prácticos del laboratorio al comienzo del mismo. Andrea fue quién, a pesar de todo siempre me animó a continuar con la tesis.

TABLA DE CONTENIDO

| | Página |
|--|--------|
| PÁGINA DE APROBACIÓN..... | II |
| AGRADECIMIENTOS..... | III |
| LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES..... | VI |
| | |
| 1. <u>INTRODUCCIÓN</u> | 1 |
| 1.1 <u>OBJETIVOS</u> | 2 |
| 1.1.1 <u>Objetivo general</u> | 2 |
| 1.1.2 <u>Objetivos específicos</u> | 2 |
| | |
| 2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> | 3 |
| 2.1 <u>DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE</u> | 3 |
| 2.1.1 <u>Propiedades y características del fruto</u> | 4 |
| 2.1.2 <u>Origen y distribución</u> | 4 |
| 2.2 <u>MEJORAMIENTO DE LA ESPECIE</u> | 5 |
| 2.2.1 <u>En el mundo</u> | 5 |
| 2.2.1.1 <u>Cultivares</u> | 5 |
| 2.2.2 <u>En Uruguay</u> | 6 |
| 2.3 <u>SISTEMAS DE PROPAGACIÓN</u> | 7 |
| 2.3.1 <u>Propagación sexual</u> | 7 |
| 2.3.2 <u>Propagación asexual</u> | 7 |
| 2.3.2.1 <u>Uso de estacas</u> | 8 |
| 2.3.2.2 <u>Uso de injertos</u> | 10 |
| 2.3.2.3 <u>Uso de acodos</u> | 11 |
| 2.4 <u>MICROPROPAGACIÓN</u> | 13 |
| 2.4.1 <u>Factores que influyen en la micropropagación</u> | 14 |
| 2.4.1.1 <u>Factores biológicos</u> | 14 |
| 2.4.1.2 <u>Factores físicos</u> | 16 |
| 2.4.1.3 <u>Factores químicos</u> | 17 |
| 2.4.2 <u>Medios de cultivo</u> | 18 |
| 2.4.3 <u>Etapas del proceso</u> | 20 |
| 2.5 <u>ENRAIZAMIENTO DE MICROESTACAS</u> | 27 |
| 2.5.1 <u>Antecedentes del Guayabo del país</u> | 27 |
| 2.5.2 <u>Auxinas</u> | 28 |
| 2.5.2.1 <u>Efectos fisiológicos</u> | 28 |
| 2.5.2.2 <u>Características físicas y químicas de las auxinas</u> | 28 |

| | |
|--|----|
| 2.5.2.3 Metabolismo..... | 29 |
| 2.5.2.4 Conjugación, oxidación y actividad biológica..... | 29 |
| 2.5.3 <u>Otros compuestos inductores de raíces adventicias</u> | 30 |
| 2.5.3.1 Óxido nítrico | 30 |
| 2.5.3.2 Floroglucinol..... | 31 |
| 3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> | 34 |
| 3.1 MATERIAL VEGETAL..... | 34 |
| 3.2 PREPARACIÓN DE LA PLANTA MADRE | 34 |
| 3.3 DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL..... | 34 |
| 3.4 INTRODUCCIÓN DEL MATERIAL..... | 35 |
| 3.5 ENSAYO DE MULTIPLICACIÓN | 36 |
| 3.6 ENSAYO DE ENRAIZAMIENTO | 37 |
| 3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 37 |
| 4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u> | 40 |
| 4.1 ENSAYO DE ESTABLECIMIENTO | 40 |
| 4.1.1 <u>Sobrevivencia</u> | 41 |
| 4.1.2 <u>Oxidación</u> | 42 |
| 4.1.3 <u>Contaminación</u> | 43 |
| 4.2 ENSAYO DE MULTIPLICACIÓN | 45 |
| 4.3 ENSAYO DE ENRAIZAMIENTO | 47 |
| 5. <u>CONCLUSIONES</u> | 53 |
| 6. <u>RESUMEN</u> | 54 |
| 7. <u>SUMMARY</u> | 55 |
| 8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> | 56 |

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

| Cuadro No. | Página |
|--|--------|
| 1. Composición del medio Woody Plant Medium (WPM)..... | 35 |
| 2. Concentraciones de vitaminas del medio Murashig Skoog (MS)..... | 36 |
| 3. Fuentes de variación, grados de libertad y valores de $p < F$ del ANAVA para las variables oxidación, contaminación y sobrevivencia..... | 41 |
| 4. Supervivencia promedio por tratamientos de desinfección (Tukey, $p < 0,05$)..... | 41 |
| 5. Fuentes de variación, grados de libertad y valores de $p < F$ del ANAVA para la variable proliferación de brotes..... | 45 |
| 6. Fuentes de variación, grados de libertad y valores de $p < F$ del ANAVA para las variables porcentaje de enraizamiento y número de raíces/estaca..... | 47 |
| | |
| Figura No. | Página |
| 1. Introducción (izquierda- contaminación por bacteria en el clon C74, derecha- presencia de callosidad en explantos en el clon CCH)..... | 40 |
| 2. Presencia compuestos de fenólicos en medio de cultivo y explantos en el clon C74..... | 42 |
| 3. Explantos del clon C74 en medio WPM con 1 mg L^{-1} de zeatina puestos a multiplicar ya brotados..... | 45 |
| 4. Tasa de proliferación de yemas según genotipos con el agregado al medio WPM de 1 mg L^{-1} zeatina..... | 46 |
| 5. Resultados de prueba de comparación de medias de Tukey ($p > 0,05$) para porcentaje de enraizamiento por genotipo..... | 48 |
| 6. Resultados de prueba de comparación de medias de Tukey ($p > 0,05$) para número de raíces/estaca por genotipo..... | 49 |
| 7. Enraizamiento del clon C74 en medio WPM sin hormonas..... | 49 |

1. INTRODUCCIÓN

Acca sellowiana (Berg.) Burret, conocido como Guayabo del país o “Feijoa” es un árbol de tamaño mediano de la familia Myrtaceae, nativa del sureste de Brasil y Uruguay. Hace más de un siglo fue colectado material en nuestro país, llevado a Francia, de dónde fue distribuido a varias partes del mundo; a partir de dicho material, se han iniciado programas de mejoramiento y cultivos comerciales (Ducroquet et al., 2000). Actualmente existe una producción comercial significativa de esta especie que se limita a Nueva Zelanda, Georgia, Azerbaiyán, Colombia y California, aunque existe gran interés en establecer la producción comercial en Uruguay y Brasil (Dos Santos et al., 2011).

La apuesta al desarrollo del cultivo de Guayabo del país en Uruguay se justifica por el éxito de la especie en otros lugares del mundo, la necesidad de diversificar la oferta frutícola, las cualidades nutricionales de la misma, la amplia gama de sitios a los que se adapta y su valor ornamental. El enfoque frutícola está dado por el alto potencial agronómico atribuido a su gran adaptabilidad a diferentes condiciones climáticas, resistencia a las heladas, precocidad productiva de alto valor nutritivo, buena vida pos cosecha y por presentarse adecuado para el consumo en fresco, así como para la elaboración de productos manufacturados (Rivas et al., 2007). Asimismo, esta especie es valorada por su carácter medicinal debido a propiedades del fruto como fuente antioxidante, antibacteriano, antiinflamatorio y quizás como agente anti-mutagénico (Vuotto et al., 2000).

Al ser una especie nativa es valorada por los pobladores locales que conocen y valoran el recurso genético, siendo ellos los actores fundamentales para la conservación, domesticación y utilización de la especie *in situ*. Al tratarse de una especie predominantemente alógama, presenta como gran limitante la enorme variabilidad de genotipos en cultivo, lo que ha determinado una producción muy heterogénea en cuanto a productividad y calidad de la fruta (Cunda, 2006). Por tal motivo, surge la necesidad de propagarla vegetativamente. Sin embargo, el bajo éxito alcanzado por propagación vegetativa convencional de materiales seleccionados, es una limitación importante para su producción con fines comerciales. En estas circunstancias la micropropagación se ha considerado una alternativa a la producción de plantas de alta calidad y libres de patógenos.

El presente trabajo se enmarca dentro del Programa de Frutales Menores de la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía (E.E.F.A.S.), que junto al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) y al Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP), han llevado adelante estudios desde 1998 respecto a la prospección, al estudio de la diversidad genética, al valor agronómico y al potencial

comercial de especies nativas, tendiente a la selección, conservación y utilización de materiales potencialmente interesantes. Desde 2005 el Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Agronomía, realiza trabajos con el objetivo de ajustar un protocolo para la multiplicación masiva *in vitro* de materiales seleccionados en el Programa Frutales Menores (EEFAS). La finalidad de estos estudios es poder satisfacer la demanda del sector productivo, proporcionando masivamente materiales con características productivas destacadas para la obtención de cultivos uniformes de Guayabo del país.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Optimizar un protocolo de micropropagación a partir de materiales de Guayabo del país preseleccionados por el Programa de Frutales Menores.

1.1.2 Objetivos específicos

- Evaluar diferentes tratamientos de desinfección para ajustar la metodología en el establecimiento *in vitro*.
- Evaluar el efecto de la zeatina en inducir la proliferación de brotes en la etapa de multiplicación.
- Evaluar el efecto de distintos compuestos en la inducción de raíces adventicias.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

El Guayabo del país (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret), pertenece al orden *Myrtales*, familia *Myrtaceae*, subfamilia *Mirtoideae*, tribu *Myrtae*, género *Acca* (Berg). En Brasil se le conoce como “Goiabeira serrana”, “Goiabeira do mato” y “Goiaba do campo”; en California como “Pineapple guava” y en Europa y Oceanía como “Feijoa” (Ducroquet et al., 2000).

Es un arbusto de hasta 4 m de altura, muy ramificado, en condiciones bajo cultivo puede llegar a 5 m o poco más (Tálice et al., 1996). Presenta una corteza escamosa color rojizo con follaje y flores vistosas, la copa es muy ramificada con hojas persistentes (Mattos 1986, Ducroquet et al. 2000). Las hojas son simples, opuestas, pecioladas, las mismas presentan lámina sub coriácea y ovada, pudiendo variar entre oval oblongas y obovadas. Son verde oscuras, lúcidas y brillantes en el haz con nerviación poco visible, mientras en el envés se encuentra una pilosidad dando un aspecto lanoso-tomentoso otorgando un color blanquecino grisáceo (Tálice et al., 1996).

Los botones florales se presentan solitarios o en grupos de no más de 5 y son característicos por su forma globosa. La estructura floral se compone de un cáliz con cuatro sépalos desiguales oval - oblongos, redondeados en el ápice, dos exteriores opuestos, y dos interiores algo menores. La corola está conformada por cuatro pétalos carnosos, de forma ovada y profundamente recurvados, color rojizo por dentro y blanco-ceroso por fuera, muy vistosos y comestibles. Existen cerca de 60 a 90 estambres purpúreos derechos en el botón floral, que culminan en anteras ovadas de color amarillo y el estilo es violeta, glabro con estigma capitado (Legrand 1968, Ducroquet et al. 2000).

El fruto es de forma elipsoide a obovoide u ovoide, a veces esferoide, de 2-5 cm de largo, 2,5-6 cm de ancho, verde a oscuro verde, sub-ácido, con glándulas de aceite justo debajo de la epidermis (Thorp y Bielieski, 2002). La piel o cáscara es pruinosa, verde oscuro intenso cuando inmadura y varía algo al verde amarillento al madurar. La epidermis del fruto incluye una capa blanca de pulpa granular que, según Downs et al., citados por Fisher (2003), contiene esclereidas que dan al fruto una cierta textura arenosa. Según Tocornal, citado por Ducroquet et al. (2000) el peso varía entre 25 y 60 g, aunque algunos cultivares llegan a pesos de 130 g o más. Las semillas son numerosas, más o menos redondas, aplanadas, muy pequeñas 1.9- 3,4 mm de largo.

Es una especie de fecundación cruzada, las flores son hermafroditas, existiendo individuos auto-fértiles, aunque predomina la auto-incompatibilidad (Tálice et al., 1996). Si la fecundación es cruzada se consigue un cuajado con valores medios del 80 al

90%, mientras que en el caso de autofecundación el porcentaje se reduce a la mitad, obteniendo además frutos de menor tamaño (Azam et al., citados por Fisher, 2003). Lüdders y Schumann, citados por Fisher (2003) afirman que uno de los problemas más grandes del cultivo de esta especie es la caída de flores y frutos y, como consecuencia, el cuajado es deficiente, presentando variaciones altas en forma, tamaño y calidad de los frutos. Una de las razones más importantes para este comportamiento es la protoginia, por el hecho de que el estigma se vuelve receptivo 24 horas antes de la dehiscencia de las anteras (Ducroquet et al., 2000).

2.1.1 Propiedades y características del fruto

En virtud de las propiedades nutricionales y organolépticas, el fruto es destinado principalmente al consumo en fresco. Además las frutas pueden ser procesadas para la producción de jugos, jaleas, helados y para la producción artesanal de bebidas, entre otros (Ducroquet et al., 2000). En Nueva Zelanda existen varios productos de esta especie: mermelada, helado, vino espumoso, jugo puro, jugos mezclados con otras frutas, néctar, salsa y alimentos procesados (Thorp y Bielecki, 2002). En Colombia, además de los productos antes mencionados, se destaca el consumo de trozos de fruta deshidratados (Nagle, citado por Dos Santos et al., 2009).

Desde el punto de vista nutricional, el fruto se caracteriza por su alto contenido de yodo (3mg/100grs) y vitamina C (35mg/100grs) (Hoffmann et al., citados por Parra y Fisher, 2013), además de grandes cantidades de ácido ascórbico, carbohidratos y minerales (Vuotto et al., 2000). La fruta contiene muchos compuestos volátiles incluyendo terpenos, taninos, quinonas, saponinas esteroidales, flavonoides y ambos metil y etil-benzoato, que representan cerca del 90% de la fracción volátil, y son responsables del típico aroma fuerte del Guayabo del país (Binder y Flath, Shaw et al., citados por Vuotto et al., 2000).

Según Weston (2010) se ha comprobado propiedades farmacológicas de los frutos, destacándose las actividades antibacteriana y antioxidante. Estudios realizados en extractos poli fenólicos de esta especie arrojaron que la acción antioxidante es muy superior a otras frutas tropicales. Se han identificado productos relacionados, como los elagitaninos en hojas, estos polifenoles son conocidos por ser inhibidores del crecimiento selectivo de los tumores cancerígenos (Bontempo et al. 2007, Okuda et al., Amakura et al., citados por Weston 2010).

2.1.2 Origen y distribución

Según Ducroquet et al. (2000) la especie está ampliamente distribuida extendiéndose desde el sur del estado de Paraná, en Brasil, en Uruguay, incluyendo el noreste de Argentina y sur de Paraguay. Existen pequeños núcleos aislados de Guayabo del país en Misiones, aunque existen dudas sobre si su origen es silvestre. En Paraguay

no ha sido confirmada la presencia de poblaciones nativas, pudiéndose tratar de una confusión con el nombre vernáculo (Ducroquet et al. 2000, Cunda 2006).

Su difusión en hemisferio norte se inició por un ejemplar introducido en el sur de Francia de procedencia uruguaya en 1890. Fue introducido en la península de Crimea, de donde se expandió a las regiones caucásicas especialmente Azerbaiyán y Georgia; donde este frutal se encontró con su primera expansión comercial significativa (Evreinoff, citado por Ducroquet et al., 2000). Al comienzo del siglo XX fue introducido en California de plántulas oriundas de Uruguay, posteriormente también a Florida, luego prácticamente todo el material fue difundido en EEUU, llevados de California a Australia y a Nueva Zelanda (Popenoe, citado por Ducroquet et al., 2000). Más tarde existieron otras introducciones en Nápoles y de ahí se propagó a quintas del sur de Italia y Sicilia (Rotundo, citado por Thorp y Bielecki, 2002) y en Colombia especialmente en los departamentos de Boyacá, Cundinamarca, Caldas y Antioquia (Parra y Fisher, 2013).

La especie es explotada comercialmente con mayor intensidad en los Estados Unidos (California y Florida), en Colombia y en las ex Repúblicas Soviéticas del Cáucaso y especialmente en Nueva Zelanda (Barni et al., citados por Dos Santos et al., 2009).

2.2 MEJORAMIENTO DE LA ESPECIE

2.2.1 En el mundo

2.2.1.1 Cultivares

Francia es el primer país occidental donde el Guayabo del país fue cultivado y seleccionado. Sin embargo la producción ha sido poco importante y tampoco ha existido en los últimos tiempos un desarrollo de cultivares. Existe una selección llamada Deslogesii que ha dado frutos que han pesado hasta 86 g (Thorp y Bielecki, 2002). En España son citados tres cultivares: Alpe, Castroviejo e Vilgarcia, como productivos y bien adaptados a las condiciones agroclimáticas de Galicia dónde, sin embargo, produce frutas pequeñas. En Australia el cultivar que se ha utilizado es el llamado Large Oval (Evreinoff, citado por Ducroquet et al., 2000), en Rusia existen cuatro selecciones Precoce de Crimee, Perfume de Nikita, Nikita y Cotele de Crimee (Thorp y Bielecki, 2002). En Italia se estableció una colección en la Universidad de Nápoles en Portici y a partir de dicho material se realizaron varias selecciones Portici S, Portici W, Portici X y Portici Y. En Israel actualmente existe un cultivar, llamado Slor y otro cultivar llamado Vilo de fruto pequeño (Slor, citado por Thorp y Bielecki, 2002). En Colombia fueron seleccionados tres cultivares, existiendo una producción significativa de frutos relativamente pequeños Rionegro (65 g), Tibarosa (40 g) y Niza (22 g) (Pachón y Quintero, citados por Ducroquet et al., 2000).

Según Anón, citado por Thorp y Bieleski (2002) el primer cultivar de Guayabo del país seleccionado en California fue Coolidge, más tarde fueron seleccionados los cultivares Choiciana y Superba. Estos cultivares fueron los elegidos por muchos años, y comenzaron siendo varios progenitores de otras selecciones en otros países. El cultivar Coolidge, fue merecedor de atención, por ser autofértil y productivo. Los cultivares que parecen ser los más prometedores fueron liberados por una investigación oficial en Nueva Zelanda. Prometedores por productividad y tamaño de fruta, que, bajo condiciones adecuadas de polinización, pesaban 100 g, llegando a 250 g, como Apollo (autofértil) y Gemini y más recientemente Opal Star, Pounamu y Kakapo. Algunos otros cultivares son también muy apreciados por los productores neozelandeses, como Unique (auto fértil), Robert y Gracie (Ducroquet et al., 2000).

En Brasil principalmente, el Guayabo del país ha sido estudiado desde 1986, por la Empresa de Investigación Agropecuaria y Extensión Rural de Santa Catarina SA (EPAGRI), con el fin de seleccionar genotipos superiores y desarrollar un sistema de producción que permita su cultivo a escala comercial. Como resultado del trabajo, fueron lanzados en 2007 y 2008, los primeros cuatro cultivares brasileños: Alcántara, Helena, Mattos y Nonante (Ducroquet et al. 2000, Vidal Talamini do Amarante y Dos Santos 2011).

2.2.2 En Uruguay

El Guayabo del país ha sido incorporado al programa de selección de frutas nativas con potencial comercial que lleva adelante, la Facultad de Agronomía desde el año 1998, y al cual, dos años más tarde, se incorporaron el Programa de Investigación en Producción Frutícola del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), y la Dirección Forestal del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) además de varios actores sociales. Dicho programa tiene por objetivos estudiar la diversidad genética, el valor agronómico y el potencial comercial, tendiente a la selección, conservación y utilización de algunas especies pertenecientes a la familia de las Myrtaceae identificadas como promisorias. En el marco de este trabajo, se realizó una prospección en parques, jardines, quintas frutales y áreas silvestres, en diferentes regiones del país, que tuvo como principal criterio de selección, la detección de fruta de buena calidad para consumo fresco e industrialización. Las plantas seleccionadas se encuentran instaladas en los jardines de introducción de la Estación Experimental de Facultad de Agronomía de Salto (EEFAS) y en la Estación Experimental 'Wilson Ferreira Aldunate de INIA Las Brujas, en Canelones. Allí se estudian las características de adaptación al cultivo sistematizado, la fenología vegetativa y reproductiva, así como la producción y calidad de fruta. Las principales limitantes al desarrollo de este cultivo, según manifestaron técnicos y productores, han sido la gran variabilidad genética en cultivo a nivel vegetativo, de producción y calidad de fruta (Vignale y Bisio 2004, 2005, Cabrera et al. 2010, 2014).

Complementariamente con este programa se desarrolló el proyecto de investigación: “Primer estudio sistemático de las poblaciones de *Acca sellowiana* (Berg.) Burret, como recurso genético”, iniciado en el 2005. El objetivo del proyecto fue estudiar la diversidad de la especie en estado silvestre y en otros tipos de ambientes y caracterizar la diversidad genética mediante caracteres morfo-fenológicos y moleculares. Paralelamente se evaluó el comportamiento y propagación *in vitro* para la conservación y multiplicación de los genotipos seleccionados (Vignale y Bisio, 2005).

En el Jardín de Introducción ubicado en la Estación Experimental de Facultad de Agronomía de Salto (EEFAS) se han evaluado caracteres morfológicos y agronómicos a lo largo de varios años, detectándose una gran variabilidad en caracteres como tamaño y forma de las frutas, sabor, espesor de cáscara, época de maduración y productividad (Vignale et al., 2006). El estudio de 33 genotipos destacados demostró una importante riqueza alélica, claramente diferenciada de materiales provenientes de Brasil y Nueva Zelanda. Este resultado, sumado a la muy buena performance agronómica de los materiales, los posiciona como un germoplasma valioso para la aplicación de esquemas de mejoramiento genético. El uso de herramientas biotecnológicas que auxilien estos eventuales programas de mejoramiento permitiría reducir en costos y tiempo en la obtención de cultivares adaptados a las condiciones locales (Quezada, 2011).

2.3 SISTEMAS DE PROPAGACIÓN

2.3.1 Propagación sexual

La semilla es uno de los métodos principales de reproducción de las plantas en la naturaleza y uno de las más eficientes y más empleados en la propagación de plantas cultivadas. La variabilidad genética derivada del proceso de formación de gametos y posterior fecundación es importante para permitir la adaptación continuada de las especies a posibles cambios en el ambiente. Sin embargo, la propagación de plantas cultivadas requiere que las características que han sido seleccionadas como importantes se perpetúen en la siguiente generación (Hartmann y Kester, 1998). La propagación sexual presenta inconvenientes relacionados con la alta variabilidad presente en las plantas obtenidas, la producción tardía y los procesos de alternancia presentes en algunos cultivares (Fischer et al., 2003). Al tratarse de una especie en fase inicial de mejoramiento del cultivo, esta especie en su gran mayoría es propagada normalmente por semillas (Fachinello et al., 1994).

2.3.2 Propagación asexual

La propagación asexual es posible porque cada célula de la planta contiene la información genética necesaria para regenerar la planta entera. Esta propiedad de las células vegetativas se denomina totipotencia y como únicamente están involucradas divisiones mitóticas, se origina un clon, en donde las características específicas de

cualquier planta individual son perpetuadas por propagación vegetativa. La clonación adquiere particular importancia en fruticultura, ya que la mayoría de los cultivares de plantas frutales tienen un genotipo altamente heterocigoto y las características únicas de dichas plantas se pierden al propagarlas por semilla. En términos generales, la propagación vegetativa no es más económica que la propagación por semilla, sin embargo su empleo se justifica por la superioridad y uniformidad de los clones específicos y la eliminación de la fase juvenil, acortando así el tiempo para llegar a la madurez reproductiva (Hartmann y Kester, 1998).

Para obtener plantas con frutos de alta calidad y producción uniforme es necesario propagar los materiales seleccionados por técnicas vegetativas, aunque en comparación con otros frutales, el Guayabo del país es relativamente difícil de propagar usando estas técnicas (Thorp y Bielecki, 2002). Entre las técnicas que se han evaluado para la propagación de esta especie, podemos citar el uso de estacas, injertos, acodos y micropropagación.

2.3.2.1 Uso de estacas

Una estaca es un segmento obtenido de una parte del tallo, ramas, raíz u hoja, la cual se separa de la planta madre, se coloca bajo condiciones ambientales favorables y se le induce a formar un sistema de raíces y un nuevo sistema caulinar (Fischer et al., 2003). El estaquillado es el método más eficiente de propagación vegetativa, especialmente cuando no se dispone de porta-injertos que tengan alguna ventaja en términos de precocidad, porte de las plantas, tamaño de los frutos, o resistencia a plagas y enfermedades del suelo (Ducroquet et al., 2000).

El enraizamiento de las estacas depende de varios factores como el potencial genético, la condición fisiológica y nutricional de las plantas madres, la edad de la planta, la época de cosecha y el tipo de estaca, la concentración del regulador de crecimiento aplicado y la concentración endógena del mismo. La aplicación de ácido indol butírico (AIB) aumenta la concentración de auxinas en la base de la estaca, promueve la activación de las células del cambium y favorece la formación de raíces adventicias. Las respuestas del Guayabo del país al enraizamiento de estacas tratadas con AIB son muy variadas y dependen del tipo de estaca y de la forma de aplicación del regulador de crecimiento (Countinho et al., Nachtigal et al., Nachtigal y Fachinello, citados por Fischer et al., 2003).

Sampaio y Barbim (1983) trabajando en propagación de peral, refieren que en materiales de difícil enraizamiento es recomendable utilizar estacas herbáceas y condiciones de nebulización. Hartmann y Kester, citados por Sampaio y Barbim (1983) reportaron que la nebulización mantiene la humedad alrededor de las hojas, disminuye la presión de vapor de las mismas, reduce la temperatura y tasa de respiración. Por

consiguiente permite mantener las hojas funcionales por largos periodos de tiempo lo cual puede ser decisivo en el enraizamiento. Por otra parte, Fischer et al. (2003) señalan que el AIB favorece el número de raíces formadas en las estacas de Guayabo del país .

Un estudio realizado por Arteca, citado por Fischer et al. (2003) refiere que la utilización del AIB puede influenciar en el porcentaje de sobrevivencia de las estacas. Observó que el 50% de las estacas tratadas con AIB permanecieron vivas debido a que el enraizamiento favorece el mantenimiento del estatus hídrico, impidiendo su deshidratación; y la aplicación exógena de auxinas también pudo haber atrasado la senescencia de los tejidos.

Figueiredo et al. (1995) probaron diferentes concentraciones de AIB en esta especie, asociado o no con el sombreado de las ramas, en diferentes épocas del año, y en promedio no superaron el 10% de enraizamiento. Resultados ligeramente mejores fueron obtenidos por Duarte et al. (1992) que utilizaron estacas semi leñosas colectadas en marzo, tratadas con AIB (5000 ppm) en inmersión rápida, y sobre un régimen de niebla intermitente, en el cual se obtuvo hasta un 31.6% de estacas enraizadas.

Según Ducroquet et al. (2000) una técnica utilizada en Nueva Zelanda consiste en coleccionar en mayo estacas semi leñosas de esta especie de 15-20 cm, con 3 entrenudos, conservando dos hojas en el nudo superior de la estaca; y la base de las mismas son tratadas con AIB (2000 ppm) por inmersión rápida. Las tasas de prendimiento han resultado variables entre 4 y 76%, siendo el cultivar el principal factor de variación.

En un trabajo realizado por Franzon et al. (2004), se realizaron dos experimentos evaluándose en el primer caso, el efecto de AIB (0, 200 y 400 mg L⁻¹) en estacas, en inmersión rápida por 24 horas, retiradas de diferentes porciones de la rama (apical, medio y basal). En el segundo caso se trabajó con estacas herbáceas evaluando el efecto de AIB (0, 2000, 4000 y 8000 mg L⁻¹) sobre estacas de diferentes tamaños (12 y 18 cm). Como resultado, no ocurrió formación de raíces en las estacas de Guayabo del país en ninguno de los tratamientos aplicados en los experimentos. La sobrevivencia de las estacas leñosas tendió a ser mayor en aquellas retiradas de la porción basal de la rama y en las estacas de 12 cm de longitud. Hubo fitotoxicidad por AIB en las estacas herbáceas, en concentraciones a partir de 4000 mg L⁻¹, y bajo porcentaje de formación de callo en las mismas.

Según Salvarrey (2008) el estaquillado es viable en esta especie cuando se utiliza estacas semileñosas colectadas en período de post-cosecha, tratadas con ácido indolbutírico a 2000 ppm. En dicho estudio se obtuvo un bajo porcentaje de enraizamiento (0,2%). Este resultado puede deberse a que el material de partida era tejido maduro (plantas que superaban los 28 años) aunque se hayan realizado previamente prácticas como la poda, para favorecer la emisión de formas juveniles y

también podría ser por el grado de contaminación de las plantas madre. El resultado mostró efecto genotipo independientemente del tratamiento. En cuanto a la aplicación de hormonas no existieron diferencias significativas entre aplicar o no por lo tanto se concluyó que ésta no afectó el porcentaje de enraizamiento.

De acuerdo a lo mencionado por Hartmann y Kester (1998), en plantas de difícil enraizamiento, como es el caso del Guayabo del país, la edad de la planta madre puede ser un factor determinante en la formación de raíces. Estos autores mencionan que las estacas de tallo o de raíz tomadas en la fase de desarrollo juvenil del crecimiento, como se encuentran las plántulas jóvenes, con frecuencia forman nuevas raíces con mucha mayor facilidad que aquellas tomadas de plántulas que están en fase adulta de su desarrollo, ya sea procedentes de semilla o propagadas vegetativamente. Apoyando este concepto Fachinello et al. (1994) mencionan que las concentraciones de auxinas endógenas (AIA) son mayores en las regiones de síntesis, donde el crecimiento es activo, y son muy bajas en tejidos ya diferenciados.

En un trabajo realizado por Cabrera et al. (2010) fueron utilizadas estacas semi-leñosas (ramas del año) de pantas de 2 años de edad, procedentes de semilla de Guayabo del país, de 10 orígenes diferentes y evaluados en dos concentraciones de AIB (0 y 2000 ppm) en inmersión rápida (5 seg). Las estacas fueron colocadas en cama caliente conteniendo 75% de perlita y 25% de turba y bajo un sistema de nebulización intermitente. Observaron que la capacidad de enraizamiento era altamente variable, dependiendo de cada material genético, e independiente del sitio donde se colectó el mismo. El enraizamiento también fue variable dependiendo de la utilización de AIB logrando un aumento en el enraizamiento en algunos materiales y teniendo a su vez acción negativa en otros.

Otro estudio realizado por Cabrera et al. (2014) en esta especie, evaluaron estacas de 12 cm de longitud de 10 híbridos el efecto de AIB (0, 1500 ppm) en inmersión rápida (5 seg), y sobre un régimen de niebla intermitente, en el cual se obtuvo significativamente 36.8% de estacas enraizadas con AIB, mientras sin AIB se obtuvo en promedio un 15.7% de estacas enraizadas. También se evaluó el enraizamiento en arena y perlita, se observaron diferencias a favor de la perlita logrando 34.1% enraizamiento, mientras que en arena se alcanzó solamente un 18.4% de estacas enraizadas. El porcentaje de estacas enraizadas osciló entre un 0% y un 66.8%, variando según el genotipo utilizado.

2.3.2.2 Uso de injertos

El injerto es un procedimiento mediante el cual se unen entre sí dos porciones de tejido vegetal viviente de tal manera que se unan y posteriormente crezcan y se desarrollen como una sola planta (Hartmann y Kester, 1998). Las dos partes que se unen

se denominan patrón o porta injerto y la segunda se llama copa, púa o yema (Fischer et al., 2003). Hartmann y Kester (1998) definen al patrón (pie, masto o porta injerto) como la parte inferior del injerto que se desarrolla y forma el sistema radical de la planta injertada. Puede proceder de semilla, de una estaca enraizada o de una planta acodada. La púa es un pequeño trozo de rama separado de la planta madre que contiene varias yemas en reposo y que cuando se une con el patrón forma la porción superior de injerto de la cual crece el tallo y las ramas. Debe ser del cultivar deseado y debe estar libre de enfermedades. El injerto de yema es similar al injerto común, excepto que la púa se reduce en tamaño y contiene una sola yema.

Según Cacioppo (1988) los tipos de injerto que mejor responden en Guayabo del país, son el de hendidura total y el inglés o de lengüeta. En los dos casos es necesario que tanto el patrón como la púa tengan el mismo diámetro. En España los mejores resultados se obtienen cuando dicho diámetro es de 7 u 8 mm, y las púas son tomadas de brotes de un año, dejando dos hojas y cuando el injerto es realizado en octubre.

Otros autores también evaluaron el injerto de lengüeta simple y doble lengüeta al final del invierno, indicando que son viables cuando tiene aproximadamente un año de edad y diámetros en el entorno de 7 mm en el punto del injerto (Mielke y Fachinello 1993, Ducroquet et al. 2000). También fue evaluado el injerto de doble lengüeta por Salvarrey (2008) en dos épocas del año, obteniendo en primavera (50%) de prendimiento, respecto a un (24%) obtenido en el mismo año en otoño. Mielke y Fachinello (1993) obtuvieron al final del invierno 45% de prendimiento en injerto de lengüeta simple y 35% en injerto de doble lengüeta. También los mismos autores evaluaron otros tipos de injerto, obteniendo 57,5% de prendimiento con injerto de yema con leño y resultados bastante menores obtuvieron cuando realizaron injerto de raíz.

Según Fischer et al. (2003) los injertos más utilizados en Guayabo del país son el de púa terminal y el de parche, yema o escudete. Para que los mismos sean viables, el injerto de púa terminal debe realizarse en edades tempranas del patrón, cuando el grosor del tallo es inferior a 4 mm, en el caso del injerto de parche debe removerse por completo un parche rectangular de corteza del patrón, que debe ser remplazado por un parche que debe ser del mismo tamaño. Con este último tipo de injerto se obtienen brotaciones o prendimientos inferiores al 60%. En el injerto de púa debe tomarse de tejidos de desarrollo intermedio de la planta madre y cuyo grosor coincida con el diámetro del patrón, con este método se logran prendimientos mayores al 80% a los 30 a 45 días después de realizado injerto.

2.3.2.3 Uso de acodos

El acodamiento es un método de propagación mediante el cual se provoca la formación de raíces adventicias en un tallo que está todavía adherido a la planta madre

de la cual continúa recibiendo agua y minerales (Hartmann y Kester 1998, Fisher et al. 2003). El tallo enraizado o acodado se separa para convertirse en una planta que crece en sus propias raíces (Hartmann y Kester, 1998) y en el caso particular del Guayabo del país la formación de raíces en los acodos depende del suministro frecuente de humedad, aireación, luz y temperatura moderada (Perea Dallos et al., 2010).

Mohamed, citado por Mielke et al. (1994) considera que el acodo sólo debe ser empleado cuando existiese dificultad en la utilización de otros métodos de propagación vegetativa y cita a varias frutas tropicales que pueden ser multiplicadas de esta forma. Hartmann y Kester (1998), por otro lado, citan varias especies propagadas comercialmente por este método, siendo su uso prácticamente limitado a la multiplicación de porta injertos clonales.

El Guayabo del país se puede multiplicar a través de acodo subterráneo, que consiste en bajar un gajo o rama de diámetro reducido a un surco abierto del lado de la planta madre, donde debe quedar fijo y seguro por ganchos o agarres de madera. Basta dejar la tierra en contacto con éste para que las yemas de su parte superior vayan brotando. En cuanto a la preparación de las plantas, son desenterradas las ramas enraizadas, se toma cada rama, con las raíces nacidas de las yemas, separándolos con las raíces correspondientes, formándose plántulas nuevas (Fachinello y Nachtigal, 1992).

En cuanto al acodo aéreo, Mattos (1986) menciona que es un método muy trabajoso y raramente utilizado, aunque si se quieren asegurar las buenas cualidades de determinado cultivar y presenta ramas situadas en una copa alta, se puede utilizar éste proceso.

Existen varias técnicas de acodo que pueden ser utilizadas para propagar esta especie. Sin embargo, todas ellas son muy laboriosas, y solo el encepado común es utilizado comercialmente, en Colombia, aprovechando la característica de la especie de emitir naturalmente un gran número de rebrotes al nivel del cuello, especialmente cuando la planta es nueva (Pachón y Quintero, 1992).

En Brasil se analizaron algunos factores fisiológicos involucrados en la formación y el desarrollo de raíces en plántulas de esta especie, multiplicadas por acodos de cepa. La gran mayoría de plantas evaluadas presentaron porcentajes de enraizamiento de 50% (Mielke et al., 1994). Otros autores estudiaron el acodo de cepada para esta especie y obtuvieron, una media de 6.66 plántulas enraizadas por cepa en plantas cortadas a 10 cm del suelo, cuando el cubrimiento con tierra fue realizado dos meses después del corte de las plantas (Fachinello y Nachtigal, 1992). En Uruguay se analizó esta técnica de acodo de cepada y se contabilizó los rebrotes obtenidos por planta. Los resultados mostraron que el Guayabo del país responde al estímulo de la poda invernal, pudiendo manifestar que el acodo en cepada funciona; aunque no se hayan determinado

claramente los factores que más lo determinan. Aun así, se evidenció una gran exigencia de este sistema de propagación en cuanto a sus requerimientos de agua y fertilización para obtener éxito (Salvarrey, 2008).

2.4 MICROPROPAGACIÓN

La micropropagación es definida como propagación asexual de plantas, establecidas en condiciones asépticas en medios de cultivo artificiales y en condiciones controladas de luz y temperatura (Kane et al., 2008).

Existen diferentes opciones para realizar propagación vegetativa mediante cultivo *in vitro*, una de ellas es la multiplicación a partir de yemas existentes (apicales o axilares) y otra por formación de brotes adventicios o embriones somáticos adventicios (George et al., 2008).

La micropropagación implica la producción de plántulas fenotípicamente y genotípicamente idénticas a la planta original (Krikorian, 1991). La misma es útil si se emplean materiales seleccionados según los objetivos buscados desde el comienzo. El material de partida para la mayoría de plantas ornamentales y para la producción de fruta se selecciona por algunas de sus características fenotípicas particulares (Debergh y Read, 1991). Pachón y Quintero (1992) recomiendan para el Guayabo del país seleccionar el material parental, en un jardín clonal, de plantas adultas y en producción, con una historia conocida, en un grupo de individuos de características “elite”.

La micropropagación comienza por la escisión de una pequeña porción de planta, su liberación o eliminación de microorganismos contaminantes y su instalación en un medio de cultivo. La parte de la planta que se usa para iniciar el proceso se llama explanto. Los nuevos brotes o callos que producen los explantos por proliferación son divididos en propágulos, que se vuelven a cultivar para su multiplicación. Luego los mismos desarrollan nuevas raíces o nuevos tallos y raíces, de manera que se obtiene plantitas (Fischer et al., 2003).

En la actualidad, la micropropagación se practica con éxito en especies hortícolas, ornamentales y, más recientemente, en especies leñosas (Murashige, Hughes, Thorpe, citados por Villalobos y Thorpe, 1991). Existen importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación. Las más importantes son:

- la micropropagación es más rápida y se puede realizar a gran escala,
- se logra obtener uniformidad del material clonado,
- mayor control sobre la sanidad del material que se propaga,

- facilidad para trasportar el material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones sanitarias,
- posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existan pocos individuos,
- es posible producir clones de algunos tipos de plantas que de otra manera es lenta y difícil (o imposible) de propagar vegetativamente,
- posibilita la multiplicación de grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente costeables,
- conservación de germoplasma,
- producción continúa durante todo el año e independiente de los cambios estacionales,
- el material vegetal puede ser almacenado durante largos periodos (Pierik 1990, Vidalie, citado por Villalobos y Thorpe 1991, George et al. 2008).

Existen algunas desventajas en algunos sistemas de propagación *in vitro* como es el caso de la estabilidad genética que puede ser débil. Las plantas producidas pueden mostrar características poco convenientes *in vivo*, en ocasiones las raíces formadas *in vitro* pueden resultar no funcionales dificultando aún más el enraizamiento de especies leñosas.

La transferencia de las plantas desde el tubo de ensayo al suelo es a veces difícil de conseguir; como también las plantas que han sido clonadas *in vitro* y después trasplantadas al suelo, existe el peligro en que el clon muera por la acción de patógenos. Un tema no menor es que el clonado *in vitro* exige una aportación de mano de obra importante, lo que determina precios relativamente altos para las plantas que se producen de esta forma (Smith, citado por Pierik, 1990).

2.4.1 Factores que influyen en la micropropagación

2.4.1.1 Factores biológicos

A continuación se mencionan aquellos factores biológicos que son importantes a tener en cuenta al momento de seleccionar el material de partida:

- tipo de explanto

Como se mencionó anteriormente, el explanto es una parte de un tejido de un órgano que se aísla del resto de la planta con fines de cultivo. La selección del explanto

se realiza teniendo en cuenta el sistema de propagación de la planta. Cada fracción aislada de una planta tiene su propia porción de reservas y hormonas, cuanto mayor sea el fragmento vegetal, más fácil inducir el crecimiento y regeneración (Pierik, 1990). Existe un tamaño mínimo del explanto, variable según el material vegetal, por debajo del cual no se obtienen proliferación callosa u otras respuestas deseables (Villalobos y Thorpe, 1991). En el caso de especies que se propagan vegetativamente, los brotes jóvenes y los ápices meristemáticos han sido generalmente la fuente de los explantos (Villalobos, citado Villalobos y Thorpe, 1991).

— genotipo

En relación con la especie vegetal utilizada, es importante tener en cuenta la variabilidad asociada con el genotipo. Es muy frecuente que, en idénticas condiciones de medio y ambiente, la respuesta *in vitro* de un determinado explanto difiera según el cultivar empleado (Villalobos y Thorpe, 1991). La capacidad de regeneración muestra una amplia gama entre las familias, las especies e incluso dentro de los genotipos de la misma especie. Generalmente dicotiledóneas regeneran más fácilmente que las monocotiledóneas. En general, plantas herbáceas se regeneran con más facilidad que las plantas leñosas como los árboles y arbustos (Pierik, 1990).

— edad fisiológica

La edad fisiológica del explanto tiene gran influencia en la morfogénesis. Es sabido que mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a cultivar, mejor será la respuesta *in vitro* (Villalobos et al., citados por Villalobos y Thorpe, 1991). Los meristemos apicales o yemas de brotes jóvenes suelen responder mejor que aquellos que proceden de otras partes más maduras de la planta (George, 1993). En general cuanto más alto es el vástago aislado de un árbol, menor es la probabilidad de que se formen raíces adventicias, ya que se corresponden con las más adultas (Pierik, 1990).

— planta madre

El estado fisiológico de la (planta madre) influye significativamente en su capacidad morfogenética. Se ha encontrado, por ejemplo, que los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas en diferentes edades fisiológicas (Styer et al., citados por Villalobos y Thorpe, 1991).

— época o estación del año

En general el material obtenido de invernadero regenera con mayor facilidad que el procedente del exterior por el manejo de las condiciones ambientales (Pierik, 1990). Los explantos recolectados durante estaciones húmedas presentan mayores tasas de

contaminación que cuando son recolectados en estaciones secas (Enjalric et al., citados por Lynch, 1999).

— estado sanitario

Existen más probabilidades de éxito en el cultivo *in vitro* si la planta se encuentra en un buen estado sanitario al momento del aislamiento. Para obtener un cultivo completamente estéril se deben eliminar los organismos patógenos presentes en el explanto (Pierik, 1990). Los contaminantes externos incluyen hongos, mohos, bacterias, levaduras y otros microorganismos, que se encuentran presentes en todas partes: en el aire y en la superficie de las plantas, mesas manos y demás.

También se deben eliminar los organismos patógenos internos endógenos en la fuente específica del material, pero es posible que no se detecten mientras el explanto y los propágulos subsiguientes estén creciendo en los medios del cultivo. Los virus pueden estar presentes en los tejidos de plantas sin que se presenten síntomas específicos. Ciertos contaminantes bacterianos y fúngicos algunas veces están presentes en el interior de la plantita pero no crecen con facilidad en medio de cultivo ya sea porque éste se ha vuelto más ácido o porque la citoquinina que hay en el medio reduce su crecimiento (Hartmann y Kester, 1998).

2.4.1.2 Factores físicos

Los factores físicos que juegan un papel más importante en el crecimiento y desarrollo son los siguientes:

— temperatura

La temperatura determina la velocidad a la cual el material crece *in vitro*. Generalmente la tasa de desarrollo disminuye a medida que las temperaturas se reducen por debajo de la temperatura óptima, mientras que por encima de la misma la tasa de crecimiento cae más rápidamente. (George et al., 2008). La organogénesis alcanza un óptimo dentro de un rango estrecho, que varía entre especies, en general en la cámara de crecimiento se mantiene constante de 24 a 26°C. La temperatura óptima para el crecimiento y desarrollo *in vitro*, es generalmente 3 a 4°C más alta que la correspondiente para el crecimiento *in vivo* (Pierik, 1990).

— luz y fotoperíodo

Existen tres aspectos del ambiente lumínico que afectan el crecimiento y la morfogénesis *in vitro*, como intensidad, y calidad de luz, además del fotoperíodo. La influencia puede ser directa, sobre el tejido ya creciente *in vitro*, o indirecta a través de

la influencia de la luz sobre las plantas iniciales. En este último caso, el crecimiento o morfogénesis *in vitro* varía según los tratamientos de luz aplicados a la planta donadora de los explantos. Se sabe muy poco sobre el efecto de la duración del día en el cultivo *in vitro*; generalmente se eligen de 14 a 16 horas, aunque también se usa luz continua (Pierik, 1990).

— humedad

La humedad en los tubos sellados es relativamente alta, consecuentemente es probable que en la cámara de crecimiento exista pérdida de agua desde los tubos (Pierik, 1990). Una humedad relativa de 70% es generalmente recomendada para habitaciones de crecimiento. Debido a que los medios de cultivo tienen alta humedad relativa son susceptibles las plántulas de convertirse en hiperhídricas. La hiperhidricidad o vitrificación es el término propuesto para definir las malformaciones que frecuentemente se observan en plantas herbáceas y leñosas que se cultivan *in vitro* (Debergh et al., citados por Debergh y Read, 1991). Con frecuencia hay grandes pérdidas cuando los brotes o plántulas que han sido cultivadas *in vitro* son transferidos a un ambiente externo. Esto es en parte debido a que puede haberse convertido hiperhídricas, y en parte porque que no están adaptados a un ambiente seco.

— intercambio gaseoso

Una buena aireación es un factor importante para el crecimiento de las células y tejidos. La formación de órganos, especialmente la formación de raíces adventicias, es facilitada por un mejor suministro de oxígeno (Pierik et al., citados por Pierik, 1990); se ha comprobado en esquejes de especies leñosas grandes dificultades en regenerar sus raíces, cuando estas se encuentran en agar.

El agregado de CO₂ *in vitro* es de escaso valor ya que la concentración del mismo en un tubo sellado es alta, además que la fotosíntesis *in vitro* es inferior a la normal, debido a la baja irradiancia (Hanson y Edelman, Ever, citados por Pierik, 1990).

2.4.1.3 Factores químicos

PH

El rango 5,0 y 6,5 es óptimo para el crecimiento, un pH menor de 4,5 o mayor que 7 generalmente frena el crecimiento y desarrollo *in vitro* (Pierik, 1990). Si el pH es demasiado bajo, la auxina (AIA) y el ácido giberélico se hacen menos estables como también la vitamina B1 y el ácido pentoténico y además, en ambos se retrasa la absorción de amonio. El agar puede perder su rigidez, y algunas sales como el fosfato y el hierro pueden precipitar. El pH puede ser ajustado durante la preparación del medio

de cultivo con hidróxido de sodio (0.1 M) o ácido clorhídrico (1.0 M) según corresponda (Butenko, citado por Pierik, 1990).

2.4.2 Medios de cultivo

En la actualidad existen innumerables formulaciones cada una de las cuales contiene entre 15 y 35 compuestos químicos que se suministran a los medios de cultivo. Componentes:

- a) agua
- b) agente gelificante (en el caso de medios semisólidos)
- c) fuente de carbono
- d) nutrientes minerales
- e) vitaminas
- f) sustancias reguladoras del crecimiento
- g) otros compuestos

a- agua

El agua constituye el 95% del medio nutritivo, en general se emplea agua destilada en vidrio Pyrex para trabajos de investigación. Cuando no es posible, se puede sustituir por agua desionizada aunque puede tener contaminantes orgánicos (Pierik, 1990).

b- agar

El agar es un polisacárido con elevada masa molecular que tiene la capacidad de gelificar medios. En medios semisólidos, generalmente se adiciona agar de 0,6% al 1%. Es importante considerar la pureza del agar, la marca comercial y las concentraciones del agar a utilizar ya que puede alterar la respuesta *in vitro* de los cultivos (Mroginski y Roca, 1991).

c- fuente de carbono

Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos, y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono. La sacarosa (2% a 5%) es el azúcar que más se utiliza, y puede reemplazarse por glucosa, y en menor medida, por fructuosa; en general, la maltosa y la galactosa son menos efectivas (Mroginski y Roca, 1991). Generalmente el crecimiento y desarrollo aumentan con la concentración de azúcar, hasta que alcanza un óptimo, disminuyendo después en muy altas concentraciones.

d- nutrientes minerales

Después de los azúcares, los minerales constituyen el grupo más importante de sustancias nutritivas del cultivo *in vitro*. Existen múltiples posibles mezclas de macro- y micronutrientes. Los medios de cultivo aportan los mismos elementos (macro y micronutrientes) que se consideran esenciales para el crecimiento de plantas enteras. El nitrógeno se suministra en forma de nitrato y/o amonio. Otras fuentes de nitrógeno incluyen glutamina, urea y caseína hidrolizada (Mroginski y Roca, 1991).

El medio de Murashige y Skoog (1962) (MS) se ha empleado de una manera muy general para todos los tipos de cultivo *in vitro* por presentarse superior que otros cultivos en iniciar organogénesis y, particularmente neoformación de yemas (Krikorian, 1991). Lloyd y McCown (1980) desarrollaron un medio denominado WPM (Woody Plant Medium), con un contenido salino sensiblemente menor, por la existencia de especies leñosas muy sensibles a la salinidad.

e- vitaminas

Si bien los medios de cultivo contienen varias vitaminas, es probable que en forma general sólo sea esencial la incorporación de tiamina (Mroginski y Roca, 1991). Las vitaminas que generalmente se usan son inositol, vitamina B1, pantotenato de calcio, ácido fólico, rivo flavina, ácido ascórbico, ácido nicotínico, piridoxina, biotina, ácido aminobenzoico, tocoferol (Pierik, 1990).

f- reguladores de crecimiento

En algunos casos se obtienen las respuestas deseadas mediante el empleo de medio básico sin reguladores de crecimiento (Mroginski y Roca, 1991). Sin embargo, en la mayoría de los casos es necesario agregar reguladores generalmente del tipo de las auxinas o las citoquininas. Las auxinas en general producen elongación celular, expansión de los tejidos, división celular y formación de raíces adventicias. Las auxinas más utilizadas en el establecimiento de los cultivos son varias, entre ellas están llamadas “naturales” como es el ácido indolacético (AIA) y el ácido indol butírico (AIB); y las llamadas auxinas “sintéticas”, entre las cuales se encuentra el ácido 2.4 diclorofenoxiacético (2.4- D), el ácido naftalen acético (ANA) (Pierik, 1990).

Las citoquininas se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y el desarrollo. Estimulan la división celular, especialmente si van en compañía de una auxina. Las concentraciones elevadas pueden inducir la formación de vástagos adventicios, y en general inhiben la formación de raíces. Las citoquininas promueven la formación de vástagos axilares porque disminuyen la dominancia apical (Pierik, 1990). Es importante tener un balance adecuado de estas hormonas; un balance de alto de

citoquina/ auxina promueve la formación de brotes axilares mientras que una balance bajo de esta relación promueve la formación de raíces. Las citoquinas más utilizadas son kinetina (KIN), 6-bencilaminopurina (BAP), y zeatina (ZEA) (Mroginski y Roca, 1991).

Las giberelinas son compuestos naturales que actúan como reguladores endógenos del crecimiento y desarrollo. El efecto más evidente es la elongación en los tallos debido a que estas estimulan la división y elongación celular, en la porción sub-apical y en el meristema intercalar. De todas las giberelinas, el ácido giberélico (GA_3) es el más utilizado en propagación in vitro (Jordán y Casaretto 2006, Azcón-Bieto y Talón 2008), en algunos casos ha demostrado ser de utilidad en cultivo de ápices o meristemas caulinares de varias especies vegetales (Mroginski y Roca, 1991).

g- otros componentes

Muchos suplementos indefinidos y de composición variable fueron empleados en medios de cultivo. Algunos de los más utilizados son el agua de coco, el jugo de frutos de tomate, el extracto de levadura, extracto de tubérculos de papa, entre otros. Muchas de estas enmiendas puede ser una fuente de aminoácidos, péptidos, carbohidratos, vitaminas y sustancias de crecimiento vegetal en diferentes concentraciones. En algunos medios se adicionan ácidos orgánicos como el ácido cítrico, el málico, el succínico y el pirúvico, como precursores de aminoácidos; también es frecuente la adición de L-glutamina y de caseína hidrolizada (Mroginski y Roca, 1991).

2.4.3 Etapas del proceso

Para tener éxito con la micropropagación se deben cumplir cinco etapas sucesivas, que convencionalmente se las identifica de la etapa 0 a la etapa 4. Cada una tiene determinado objetivo y dificultades específicas. A continuación se describe cada una de ellas, resaltando los principales aspectos que deben tenerse en cuenta.

Etapas 0: preparación del material vegetal

Esta etapa refiere a la preparación del material vegetal de partida o plantas madre. La correcta selección y preparación de la planta incide directamente sobre la calidad y su respuesta frente a los dos principales problemas que afectan al establecimiento del cultivo, que son la contaminación por microorganismos y la oxidación de los mismos (Olmos et al., 2004). Originariamente la etapa 0 se introdujo para ser utilizada como medida preventiva para problemas de contaminación (Debergh y Read, 1991).

Para lograr óptima calidad, es conveniente hacer crecer las plantas donantes por un tiempo mínimo en condiciones de invernáculo. De esta forma es posible incidir

directamente sobre el estado sanitario y calidad mediante el control de la intensidad lumínica, temperatura y reguladores de crecimiento como las citoquininas (para inducir la brotación de brotes juvenes) que darán origen a los explantos (Olmos et al., 2004).

Incluye el uso de insecticidas, fungicidas y formulaciones antimicrobianas para minimizar la posibilidad de ocurrencia de contaminación *in vitro* (George, Gurí y Patel, citados por Holdgate y Zandvoort, 1997). Es posible hacer crecer las plantas madres en circunstancias más higiénicas reducir ciertos contaminantes, especialmente aquellos relacionados con hongos (Debergh y Read, 1991).

Etapa 1: iniciación del cultivo

El objetivo de esta etapa es obtener un cultivo aséptico del material vegetal seleccionado. En esta etapa los explantos obtenidos de las plantas madres seleccionadas se establecen de manera aséptica en un medio de cultivo seleccionado para dicho material. El medio de cultivo debe ser elegido según las características que requiera la especie a propagar y el éxito es obtenido cuando los explantos son transferidos a un medio de cultivo adecuado libre de contaminantes microbianos (George et al., 2010).

La presencia de patógenos y contaminantes tiene efectos adversos sobre la sobrevivencia y el crecimiento y la tasa de multiplicación de los brotes. La contaminación por hongos y las bacterias persisten dentro de los tejidos, aunque aparenten estar libre de contaminantes. Consecuentemente es esencial que en esta etapa los cultivos estén protegidos de la presencia de los patógenos internos antes de servir como fuentes de brotes terminales o axilares en la etapa de multiplicación (Kane et al., 2008). Es indispensable que se tenga un método para desinfectar los tejidos de hongos, bacterias y otros contaminantes sin dañar la capacidad de regeneración del explanto y que se genere un ambiente que promueva la producción de brotes (Hartmann y Kester, 1998).

Después de un corto período de incubación, cualquier recipiente encontrado que se encuentre contaminado, debe ser descartado. Esta etapa sería considerada como satisfactoria cuando un número suficiente de explantos haya sobrevivido y se encuentren creciendo libres de contaminación.

a- Tratamiento de desinfección

Existen cuatro fuentes de infección: la planta (su exterior o su interior), el medio nutritivo (insuficientemente esterilizado), el aire y el operador. La más importante de estas condiciones es la planta misma, el material vegetal debería ser bien esterilizado antes de su aislamiento *in vitro* (Pierik, 1990).

Previamente a la esterilización, se debe retirar cualquier porción del suelo, porciones muertas, etc., que aun pudiesen quedar en las plantas o porciones de plantas con las que se trabaje eliminando todos los contaminantes externos (Pierik, 1990). Según Alvarado (1998) la presencia de microorganismos contaminantes como hongos y bacterias son favorecidos por las características morfológicas propias de los cultivos, o puede deberse a técnicas inadecuadas de trabajo en el laboratorio.

La esterilización química es la erradicación de microorganismos por medio de sustancias químicas (Pierik, 1990). Varios compuestos se han recomendado y entre lo más usados se encuentran el hipoclorito de sodio (cloro comercial del 2% al 5%), el hipoclorito de calcio (del 6% al 12%) y etanol al (70%) (Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994). Es común utilizar alcohol al 70% debido que al 96% deshidrata demasiado el material vegetal (Pierik, 1990). Otro producto que se utiliza es bicloruro de mercurio ($HgCl_2$) disuelto en agua corriente. Según Mroginski y Roca (1991) es un producto altamente tóxico, que debe utilizarse en bajas concentraciones y en un tiempo muy breve. Otro problema que presenta no menos importante, es la dificultad para removerlo mediante el enjuague.

Los mismos autores refieren que es conveniente utilizar desinfectantes superficiales poco tóxicos, como el hipoclorito de sodio, en tiempos no mayores de 10 minutos para no afectar la viabilidad. Así mismo, recomiendan implementar el uso de fungicidas y antibióticos posterior a los enjuagues con agua destilada esterilizada del desinfectante, o cuando se va a iniciar el cultivo, para que éstos queden impregnados de dichos productos y puedan actuar sobre los contaminantes. Es posible que en las irregularidades presentes en la superficie del explanto queden bacterias, esporas de hongos, polvo u otros, donde los desinfectantes no logren llegar.

Pierik (1990) recomienda en general realizar la desinfección lavando el material vegetal de forma intensiva, con agua muy limpia antes de comenzar la esterilización y cambiando el agua de forma regular. Luego sumergir el órgano en alcohol al (70%) durante algunos segundos para eliminar burbujas de aire, permitiendo así al líquido esterilizante entrar en mejor contacto con el material vegetal. Luego de sumergir el órgano en el alcohol, recomienda realizar la esterilización durante 10-30 minutos en $NaClO$ al 1%, conteniendo algunas gotas de tween 20 u 80 permitiendo un mejor contacto superficial, y luego realizar tres enjuagues en agua corriente estéril para eliminar el hipoclorito.

b- Oxidación y oscurecimiento de explantos cultivados *in vitro*

En general todos los vegetales, como producto de su metabolismo secundario normal, son capaces de biosintetizar un elevado número de compuestos fenólicos, algunos son indispensables para sus funciones fisiológicas y para defenderse ante

situaciones de estrés. El establecimiento del cultivo *in vitro* procedentes de plantas leñosas, como el caso de la mayoría de los frutales, se ve impedido por la aparición de oscurecimiento y necrosis de los tejidos. Los tejidos adultos de estas especies liberan al medio de cultivo pigmentos constituidos principalmente por polifenoles y taninos. El fenómeno de ennegrecimiento ocurre por la acción de enzimas tipo polifenol-oxidasas y tirosinasas que se liberan o sintetizan cuando los tejidos sufren lesiones o heridas. Estas actúan sobre los polifenoles y la tirosina oxidándolos a quinonas que son muy reactivas y propensas en generar daño en los tejidos, e incluso la muerte celular (Marks y Simpson 1990, Amiot et al., Bray et al., citados por Azofeifa 2009).

La oxidación también se puede generar por el desinfectante utilizado en asepsia, así como también por el daño mecánico ocasionado por los cortes del material (George, Tabiyeh et al., Van Staden et al., Abdelwahd et al., citados por Azofeifa, 2009). El problema de la oxidación se puede disminuir reduciendo la duración del proceso de escisión y esterilización o mediante la sustitución del agente desinfectante (Azofeifa, 2009). La realización de enjuagues al explanto, con agua destilada estéril, luego del proceso de desinfección es necesaria para eliminar efectivamente el agente desinfectante, así como para remover los fenoles oxidados y otros productos del daño celular formados durante la preparación y desinfección (George, 1996).

El polivinil pirrolidona (PVP) como el polivinil polipirrolidona (PVPP) han sido utilizados como adsorbentes de compuestos fenólicos en la prevención del oscurecimiento de tejidos, ya sea, siendo aplicado como enjuague o mediante su incorporación al medio de cultivo. Los mismos forman uniones hidrógeno eliminando la fracción polifenólica oxidable, arrastrando consigo los compuestos que a éstos se enlacen eliminándolos del medio, de esta manera se previene la oxidación (George, 1996). Varios autores mencionan la conveniencia de combinar el uso del PVP con algún agente antioxidante u otro adsorbente para disminuir la oxidación (Amin y Jaiswal, Teixeira et al., Gannoun et al., Abdelwahd et al., citados por Azofeifa, 2009). Los antioxidantes como el ácido ascórbico o el ácido cítrico pueden utilizarse en solución para el lavado preliminar o en el medio de cultivo, o algún material adsorbente como el carbón activado (Kane et al., 2008).

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

Etapa 2: multiplicación

Esta etapa tiene por objetivo la producción de nuevos propágulos, los cuales una vez separados del cultivo dan origen a nuevas plantas. Se debe mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos (subcultivos) y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de enraizamiento (George et al., 2010). Por lo tanto, esta etapa se caracteriza por repetidos incrementos en la formación de brotes axilares de ápices o brotes laterales cultivados en un medio suplementado con un nivel relativamente alto de citoquinina de manera de interrumpir la dominancia apical en la punta de los brotes (Kane et al., 2008).

En la etapa de multiplicación el cultivo puede suministrar brotes para una subsecuente propagación, así como también para mantener el stock. Pudiendo permanecer en esta etapa por varias generaciones sin que el explanto genere raíces (Debergh y Read, 1991). El proceso puede ser repetido en intervalos regulares. En etapas consecutivas de multiplicación, las tasas de multiplicación pueden variar de 5 a 50, dependiendo de la especie y del método de reproducción. En condiciones ideales las tasas de incremento pueden ser muy elevadas. El éxito de la multiplicación estriba en que se produzcan microestacas uniformes sin enraizar, del tamaño apropiado, que se recuperen con prontitud después de su transferencia y que empiecen a crecer de inmediato. Para obtener una producción máxima de microestacas uniformes resulta esencial seleccionar el nivel óptimo de hormonas en el medio (Hartmann y Kester, 1998).

Las citoquininas en esta etapa se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y el desarrollo, las mismas estimulan la división celular, sobre todo si van en compañía de una auxina. Las citoquininas promueven la formación de vástagos axilares, porque disminuyen la dominancia apical. La selección del tipo y concentración de citoquinina en esta etapa está determinada en base a la tasa de multiplicación, longitud de brotes, y la frecuencia de la variación genética. Aunque la proliferación de brotes se mejore en concentraciones de citoquinina más altas, los brotes que se generan son en general más pequeños y puede presentar síntomas de hiperhidricidad (Kane et al., 2008).

Dependiendo de la especie, las auxinas exógenas pueden o no mejorar la proliferación de brotes axilares inducidos por citoquinina. La adición de auxina al medio a menudo mitiga el efecto inhibitor de la citoquinina en la elongación de los brotes, de este modo aumenta el número de brotes utilizables de longitud suficiente para el enraizamiento. Este beneficio debe sopesarse contra el aumento de la probabilidad de formación de callos (Kane et al., 2008). Como guía general, si se desean obtener brotes axilares con un mínimo de callo, es necesario un alto balance de citoquinina / auxina en

una relación de 100:1, en cambio para promover la formación brotes adventicios se requiere concentraciones bajas similares de ambas hormonas (Hartmann y Kester, 1998).

Tanto la fuente de los explantos como la orientación de los mismos pueden afectar esta etapa de proliferación de brotes axilares. Los ápices de brotes que habían tenido subcultivos previos, en general, exhiben mayores tasas de multiplicación que los brotes laterales de los explantos. La inmersión de los brotes en un medio de cultivo puede duplicar o triplicar el número de brotes axilares cuando son orientados verticalmente en un período de cultivo en algunas especies (Kane et al., 2008).

El número de subcultivos posibles en la multiplicación depende de la cantidad de plantas madres disponibles inicialmente y su capacidad inherente para mantener tasas aceptables de multiplicación mientras exhiba una mínima variación genética y plantas fuera de tipo (Kurtz et al., citados por Kane et al., 2008). Algunas especies se pueden mantener con subcultivos de 8-48 meses en esta etapa.

Etapa 3: elongación e inducción o desarrollo de raíz

Algunas especies no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea (Olmos et al., 2004). Esta etapa incluye la elongación y desarrollo de raíces de las plantas. Puede implicar no sólo el enraizamiento *in vitro* de los brotes sino, también preparar a la plantita para su plantación y establecimiento fuera del medio artificial, cerrado, del recipiente de cultivo (Hartmann y Kester, 1998). El acondicionamiento de las plantas permite aumentar su potencial para la aclimatación y la supervivencia durante el trasplante a las condiciones *ex vitro* en ambientes controlados (invernadero o cámaras de crecimiento), que permitan lograr la rusticación de las plantas en forma progresiva (Olmos et al., 2004). En general, la inducción de raíces adventicias puede lograrse ya sea *in vitro* o *ex vitro* en presencia de auxinas. El enraizamiento de plantas herbáceas se puede lograr en un medio en ausencia de éstas (Olmos et al., 2004), sin embargo en muchas especies leñosas, la adición de una auxina (AIB o ANA) al medio es necesaria para mejorar el enraizamiento adventicio (Kane et al., 2008).

La principal ventaja del enraizamiento *ex vitro* en comparación con el enraizamiento *in vitro* es que las tasas de producción de raíces suelen ser mayores y la calidad de la raíz se optimiza. También permite que el enraizamiento y aclimatación se logren simultáneamente permitiendo reducir costos. Sin embargo, el estrés asociado a la transpiración acelerada de las plantas durante las etapas iniciales del trasplante puede reducir considerablemente la tasa de supervivencia (Olmos et al., 2004).

El enraizamiento *in vitro* llega a significar entre el 35-75% de los costos totales de la producción (Debergh y Maene, 1981). Esto refleja la importante aportación de mano de obra y materiales necesarios para completar la etapa de enraizamiento. En algunas ocasiones los sistemas de radicales formados *in vitro* son en gran parte no funcionales y mueren tras el trasplante (Kane et al., 2008). Por todos estos motivos muchos laboratorios prefieren realizar enraizamiento *ex vitro*, fuera del recipiente del cultivo.

Etapa 4: transferencia a condiciones de invernadero

Los explantos enraizados *in vitro* son muy sensibles a los cambios ambientales. La transición de las plantas cultivadas *in vitro* para el ambiente *ex vitro* se llama aclimatación. Este paso puede convertirse en un factor limitante en el proceso de micropropagación (Grattapaglia y Machado, 1998).

Las plantas cultivadas *in vitro* crecen en presencia de sacarosa y bajo condiciones de luz limitada y el intercambio de gases es reducido, limitando extremadamente la capacidad fotosintética. Por consiguiente las plantas cultivadas *in vitro* se comportan como plantas heterótrofas (o parcialmente autótrofas). Cuando las plantas son transferidas a condiciones *ex vitro* tienen que adaptar su metabolismo rápidamente para convertirse en plantas autótrofas para poder sobrevivir (Preece y Sutter, citados por Kane et al., 2008).

Los propágulos *in vitro* se originan en condiciones de alta humedad relativa por lo cual presentan menor contenido de cera epicuticular y un aparato estomático deficiente (George et al., 2008). Estas plantas van a perder agua rápidamente cuando sean transferidas a condiciones *ex vitro* por lo que será necesario un cambio gradual de las condiciones de crecimiento, para asegurar una mayor tasa de sobrevivencia. Por lo tanto, las plantas deben desarrollar autotrofia y raíces funcionales. Durante el periodo inicial que sigue al trasplante, son esenciales varias condiciones ambientales. Una de ellas es el mantenimiento elevado de la humedad relativa (del 50 a 100%) para proteger la planta de la desecación y permitir que inicie nuevas raíces y brotes. Luego se debe reducir gradualmente la humedad relativa durante un período de 1 a 4 semanas así como también incrementar la irradiancia. De este modo se promoverá un crecimiento vigoroso (Kane et al., 2008).

El suelo debe ser estéril, aireado y bien drenado, que permita que las raíces se desarrollen con rapidez y debe existir protección contra organismos patógenos hasta que vaya adquiriendo algo de resistencia asegurando de este modo una mayor tasa de sobrevivencia (Hartmann y Kester, 1998).

2.5 ENRAIZAMIENTO DE MICROESTACAS

2.5.1 Antecedentes del Guayabo del país

Estudios anteriores de micropropagación de Guayabo del país basados en organogénesis fueron realizados por Bhojwani et al. (1987) desarrollados a partir de explantos de meristemas y hojas jóvenes, estos autores utilizaron medio MS modificado por sales de Knop (KMS) suplementado con AIB para promover el enraizamiento. En concentraciones más bajas (0.1 mg L^{-1}) obtuvieron 85% de enraizamiento, pero en concentraciones más altas la frecuencia de enraizamiento fue menor, aumentó la callosidad en los tallos y el estado general de las raíces se deterioró. El enraizamiento *in vivo* fue alto del orden del 74% siendo las raíces más largas y delgadas en comparación con las raíces generadas *in vitro*. Bassi y Cossio (1993) probaron diferentes formulaciones salinas y encontraron superioridad en los resultados cuando utilizaron medio básico WPM (Lloyd y Mc Cown, 1980) exento de fitorreguladores. Los mismos autores realizaron pruebas con diferentes combinaciones de auxinas en medio de cultivo basal. Se le agregó al medio 1 mg L^{-1} de ANA en el cual obtuvieron un 72% de enraizamiento y el 50% de las plántulas generaron tres raíces. Con la mezcla de auxinas AIB y ANA, lograron obtener mejores resultados de enraizamiento (77%) pero con un menor número de raíces por planta.

Oltramari et al. (2000) establecieron un protocolo de propagación clonal de Guayabo del país con cuatro genotipos, utilizando como explantos segmentos nodales y microestacas. Las microestacas obtenidas *in vitro* fueron sometidas en diversos períodos de inducción con ácido indolbutírico (AIB), a una concentración de $20 \mu \text{ M}$ y en tiempos de exposición de 0, 3, 6, 9 a 12 días para inducir la raíz. Observaron que seis días con AIB ($20 \mu \text{ M}$) en medio de cultivo basal WPM proporcionaba una mayor tasa de enraizamiento, un mayor número medio de raíces y mayores longitudes de éstas. Pulsos de AIB superiores a seis días generaban una reacción tóxica en las microestacas provocando disminución en el porcentaje de enraizamiento, número y longitud de las raíces. Las microestacas enraizadas *ex vitro* fueron sometidas a diversos períodos de inducción con ácido indolbutírico (AIB), con diferentes concentraciones (0, 10 a $100 \mu \text{ M}$) y tiempos exposición (0 a 60 min). Las microestacas tratadas con AIB ($100 \mu \text{ M}$) en un tiempo de inducción de 60 minutos, resultaron en un mayor número de raíces secundarias, altura de plantas, peso fresco y seco de las raíces (Oltramari et al., 2000).

Ross y Grasso (2010) evaluaron enraizamiento de micro tallos *in vitro* y *ex vitro*. El enraizamiento *in vitro* fue realizado en un medio MS suplementado con $9.8 \mu \text{ M}$ AIB durante una semana y luego las microestacas fueron repicadas a un medio MS exento de auxina. En el enraizamiento *ex vitro* la base de los micro tallos fueron sumergidas en una solución con AIB (500 ppm) durante un minuto, y luego fueron colocados en bandejas de plástico con sustrato estéril. Ambas condiciones de enraizamiento evaluadas

promovieron diferenciación de raíz pero no se encontraron diferencias significativas en el número de micro estacas que generaron raíces, ni en el número de raíces por explanto o en la longitud de la raíz. Por lo tanto los resultados no mostraron diferencias entre enraizamiento *ex vitro* e *in vitro* con AIB obteniéndose alrededor de un 40% de enraizamiento.

2.5.2 Auxinas

2.5.2.1 Efectos fisiológicos

Las auxinas están implicadas en muchos procesos de desarrollo vegetal porque afectan la división, el crecimiento y la diferenciación de las células. Las auxinas influyen de forma decisiva en procesos como la división celular del cambium, la diferenciación vascular, la formación de raíces adventicias, desarrollo de frutos (Azcón-Bieto y Talón, 2008), establecimiento y mantenimiento de la polaridad en las plantas, mantenimiento de la dominancia apical y la mediación de tropismos (Friml, citado por George et al., 2008).

Las auxinas estimulan la formación de raíces secundarias ya que estimulan la división de las células pericíclicas en la parte superior de la zona de elongación promoviendo la formación de raíces laterales. También las auxinas promueven formación de raíces adventicias, estimulando divisiones en las células del parénquima inter-fascicular en tallos jóvenes y en adultos en el radio vascular cerca del cambium formando primordios de raíces que darán origen a raíces adventicias. En contraposición con lo que sucede con el crecimiento de la raíz primaria que es inhibida por las auxinas (Davies 1997, Jordán y Casaretto 2006).

2.5.2.2 Características físicas y químicas de las auxinas

Las auxinas naturales y sintéticas son sustancias orgánicas de bajo peso molecular, que contienen un anillo aromático o un grupo indol. Son cristalinas y ligeramente solubles en agua, pero fácilmente solubles en solventes orgánicos o, como los ácidos débiles, en soluciones acuosas alcalinas. Con la excepción del ácido indolacético (AIA) son estables y persisten en el medio de cultivo de tejidos. El AIA es la auxina menos estable y es especialmente sensible a la luz (principalmente UV) y oxidante (George et al., 2010).

Tanto las auxinas naturales como las sintéticas, tienen efectos fisiológicos similares, a pesar de sus diferentes estructuras. Para la actividad de una auxina, se requiere la presencia de una carga negativa en el grupo carboxilo de cadena lateral separada por una distancia de 0.5 nm de una carga residual positiva. El anillo indólico no es esencial para la actividad auxínica, aunque un anillo aromático está presente en la gran mayoría de los compuestos auxínicos (George et al., 2010).

Todas las auxinas activas son ácidos orgánicos débiles. La actividad de las mismas en procesos de crecimiento es muy variable. Probablemente debido a su alta inestabilidad, el AIA es generalmente menos eficaz que las auxinas sintéticas como ácido 2,4 dicloro fenoxi acético (2,4-D) o ácido naftaleno acético (ANA) (George et al., 2010).

2.5.2.3 Metabolismo

La regulación temporal y espacial de la concentración de AIA es muy importante. La velocidad de biosíntesis, conjugación, hidrolisis de conjugados, oxidación y así como la intensidad de transporte de llegada y de salida, son factores decisivos en la regulación de la concentración local de auxina del desarrollo vegetal (Azcón- Bieto y Talón, 2008).

Originalmente se creía que el único precursor de la síntesis del AIA era el aminoácido triptófano, más tarde se encontró una amplia evidencia que el AIA puede sintetizarse también a partir de precursores del triptófano (Taiz y Zeiger, 2002). La conversión del triptófano en AIA puede producirse por diferentes vías. Ruta del ácido indolpirúvico que es la ruta más frecuente en la mayoría de las especies vegetales, ruta de la indolzetaldoxima y ruta de la triptamina (George et al., 2010). Sin embargo, existen rutas alternativas independientes del triptófano siendo el precursor de esta ruta el indolglucerofosfato, que a su vez es un precursor del triptófano.

2.5.2.4 Conjugación, oxidación y actividad biológica

a- Conjugación

El nivel endógeno de auxina en la planta puede regularse no sólo por su tasa de síntesis y velocidad de transporte entre órganos, sino también por mecanismos de desactivación (Jordán y Casaretto, 2006). El AIA libre es la forma biológicamente activa de la hormona, pero en la gran mayoría de las plantas la auxina se encuentra unida covalentemente a ciertos compuestos tanto de alto como de bajo peso molecular. Estos conjugados de auxinas se consideran hormonalmente inactivos (Taiz y Zeiger, 2002). La conjugación de la auxina permite conservar la estructura de la hormona, pero la priva de actividad biológica. Es muy frecuente la conjugación con aminoácidos y con glucosa, aunque también se han encontrado auxinas ligadas a compuestos de elevado peso molecular en las que el AIA está unido a oligosacáridos, péptidos y proteínas (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Las auxinas conjugadas pueden desempeñar funciones de almacenamiento, protección, transporte y desintoxicación (Jordán y Casaretto, 2006), estabilizando el nivel de auxina en la planta (Ljung et al., Normanly et al., citados por George et al., 2010).

La auxina conjugada está protegida de la degradación oxidativa y puede ser liberada de nuevo a través de la acción enzimática (George et al., 2010). La función de almacenamiento permite la posibilidad de que las auxinas conjugadas puedan ser hidrolizadas en ciertas situaciones para dar AIA libre, lo que implica que algunos procesos de conjugación sean reversibles. También la conjugación de la auxina puede actuar como mecanismo de desintoxicación eliminando el exceso de auxina, ya que en algunos tejidos el proceso es irreversible y puede incluir la compartimentación en vacuolas o en otro espacio intra y extra celular (Azcón- Bieto y Talón, 2008).

b- Oxidación

Las auxinas pueden ser degradadas por vía descarboxilativa o no descarboxilativa. Las dos rutas oxidativas son irreversibles, y los productos resultantes carecen de actividad biológica; ello muestra que ambos procesos actúan como mecanismos de inactivación y desintoxicación de la hormona (Azcón- Bieto y Talón, 2008).

La oxidación descarboxilativa esta catalizada por la AIA oxidasa, una actividad que poseen las peroxidasas vegetales. Por otra parte, las auxinas ligadas protegen el AIA de la oxidación por la peroxidasa. El peróxido de hidrogeno, los mono fenoles y algunos iones metálicos como Mn^{+2} activan la reacción, mientras que los difenoles y los polifenoles la inhiben. Por otra parte, la oxidación no descaboxilativa sólo se ha podido comprobar en ciertas especies, en alguna de las cuales se ha confirmado la presencia de los productos de oxidación como constituyentes naturales (Azcón- Bieto y Talón, 2008).

2.5.3 Otros compuestos inductores de raíces adventicias

2.5.3.1 Óxido nítrico

El óxido nítrico (ON) es un gas altamente reactivo y ubicuo que se difunde rápidamente en las membranas celulares. Es una molécula de señalización implicada en una variedad de procesos fisiológicos durante el crecimiento y desarrollo de las plantas. El ON generado endógenamente o aplicado exógenamente regula la fisiología y desarrollo de la raíz. Participa en la formación de raíces adventicias a partir de células parenquimáticas del floema en la unión de la raíz con el hipocótilo; en la formación de raíces laterales a partir de células del periciclo; en el desarrollo de pelos radicales en la zona de diferenciación de la raíz; en la elongación de la raíz primaria estimuladas a bajas concentraciones e inhibidas en altas; en la división celular regulando positivamente genes promotores del ciclo celular durante la formación de primordios de raíces laterales y en respuestas gravitrópicas. Por consiguiente se presume que el ON participa en la ruta de señalización de auxinas incrementando la expresión de genes dependientes de auxina (Correa-Aragunde et al. 2004, Gao et al. 2011, Abu-Abied et al. 2012).

Sin embargo, no se sabe mucho sobre la compleja red molecular de funcionamiento durante la proliferación celular y la morfogénesis provocada por las auxinas y del ON en ese proceso. Un estudio realizado por Abu-Abied et al. (2012) en *Eucalyptus grandis* reveló que el gen que codifica la nitrato reductasa (NIA) se sobreexpresa en materiales juveniles, los cuales presentan mayor capacidad de enraizamiento. Dicho gen está involucrado en la biosíntesis de óxido nítrico.

Pagnussat et al. (2002) reportaron que un aumento transitorio de la concentración de ON activa mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de las raíces adventicias inducido por el ácido indol acético (AIA). Para estos autores los resultados obtenidos sugieren que proteínas quinasas activadas por mitógenos activan la cascada de señalización durante el proceso de enraizamiento adventicio inducido por AIA en una vía mediada por ON en *Cucumis sativus*.

Fernández-Marcos et al. (2011) realizaron un estudio en *Arabidopsis thaliana* en el cual encontraron que el tratamiento con ON afectaba el tamaño del meristemo en la raíz primaria, principalmente la división celular y por promover la diferenciación celular. Esto concuerda con otros estudios realizados en *Malus* (Gao y Yang, 2011) y en *Lycopersicon esculentum* Mill. (Correa-Aragunde et al., 2004) que muestran que el ON exógeno promueve el surgimiento y la elongación de las raíces laterales pero generó una inhibición en la elongación de la raíz primaria, de manera dependiente de la dosis de AIB.

Resultados similares se han obtenido con donadores de ON, nitroprusiato de sodio (SNP) y S-nitroso, N-acetil penicilamina (SNAP), que fueron capaces de imitar el efecto de la auxina (AIA) en la inducción de raíces neoformadas (Pagnussat et al., 2002). En *Cucumis sativus* (Pagnussat et al., 2002), *Lycopersicon esculentum* Mill. (Correa-Aragunde et al., 2004), *Malus hupehensis* Rehd (Gao y Yang, 2011) y *Arabidopsis thaliana* (Fernández Marcos et al., 2011) fueron realizados distintos tratamientos con diferentes concentraciones de SNP que mostraron también ser dosis dependiente en el alargamiento y en la inducción de raíces laterales como en la inhibición de la raíz primaria en dosis más altas.

2.5.3.2 Floroglucinol

El Floroglucinol (1, 2,3, trihidroxibenceno) es un ejemplo de compuesto fenólico (trifenol) producto de la degradación de la floridzina, con propiedades promotoras del crecimiento (Teixeira da Silva et al., 2013). Según George et al. (2008) la adición de compuestos fenólicos a medios de cultivo principalmente provoca un aumento del crecimiento de callos, una formación más eficaz de brotes adventicios, mejora el enraizamiento de los brotes, y provoca una mayor tasa de proliferación de brotes en ciertos cultivos debido a que éstos actuarían como sinergistas de la auxina en la

iniciación de raíces. Es común que en tejidos maduros el contenido de fenoles suele ser menor que en tejidos jóvenes pudiendo generar una disminución en el potencial de enraizamiento (Hartmann y Kester, 1998).

Muchos mono-, di- y tri hydroxy- fenoles y sus derivados más complejos que se encuentran naturalmente en las células vegetales son fuertes agentes reductores y pueden servir como sustratos para enzimas oxidativas. Cuando se añaden exógenamente hidroxifenoles actúan como sustratos alternativos para estas enzimas, y pueden proteger a las auxinas de la degradación (Stonier et al., Stonier, Thurbon y James, citados por George et al., 2008).

Existen numerosos estudios que muestran que los compuestos fenólicos, en particular, floroglucinol (PG), estimulan el enraizamiento y aceleran el desarrollo de cultivos de tejidos en varios géneros de ciertas familias como Rosáceas, Rubiáceas, Malváceas, Solanáceas y Moráceas (Pontikis y Melaza, citados por George 1993, Hammatt 1993, Sarkar y Naik 2000).

Según Teixeira da Silva et al. (2013) reportaron que el agregado de floroglucinol y auxinas estimula aún más el enraizamiento, probablemente porque el floroglucinol y sus homólogos actúan como sinergistas de la hormona o como protectores de la misma. Esto concuerda con estudios realizados por Jones, Hunter, Jones y Hopgood, citados por Pierik (1990) que indicaron que el floroglucinol puede inducir la formación de vástagos axilares, y que aplicado junto con auxinas, actúa de forma sinérgica inhibiendo a la AIA-oxidasa (responsable de la degradación del AIA), induciendo la formación de raíces adventicias.

Resultados similares fueron obtenidos en algunas variedades del género *Malus* que mostraron que el enraizamiento es estimulado cuando se añade al medio de cultivo Floroglucinol junto con auxina (Jones et al. 1977, 1979, James, Thurbon, Jones y Hatfield, Zimmerman y Broome, Zimmerman, citados por George et al. 2008). Otros estudios realizados en *Malus* más precisamente en 'Jork 9' obtenidos por De Klerk et al. (2011) estudiaron en detalle el floroglucinol y el ácido ferúlico, concluyendo que ambos compuestos actúan como antioxidantes protegiendo al AIA de la descarboxilación y al tejido del estrés oxidativo, dependiente de la dosis y el tiempo de acción. Otros trabajos realizados en *Theobroma cacao* por Passey y Jones (1983) mostraron que el floroglucinol mejora el enraizamiento junto con AIB y ANA a determinadas concentraciones, resultando menos eficaces cuando son utilizadas aisladamente. También fue demostrado en ciertas Rosáceas que el floroglucinol y sus análogos promovían el enraizamiento sinérgicamente con AIB (pero no con ANA) como es el caso de *Prunus* (Hammatt, 1993), *Fragaria* (George, 1993) y ciertos genotipos de *Rubus* (James et al., 1980).

Otros estudios realizados en *Prunus avium* L. sugirieron que PG estimula el enraizamiento en ausencia de auxina exógena. La respuesta obtenida por el PG se consideró que podía estar afectada por el genotipo y el estado fisiológico de los tejidos. Porque el PG en medio sin auxina estimuló el enraizamiento a partir de cultivos que habían adquirido la capacidad de responder a la auxina durante, antes y después de un aparente rejuvenecimiento. Esto sugiere que el PG puede mejorar el enraizamiento por influir en el metabolismo de las auxinas, o alternativamente por mantener el potencial redox del tejido en estado reducido (Hammatt, 1993).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado proviene de plantas madre de entre 4 y 6 años, seleccionadas por calidad de fruta en el marco del Programa Frutales Menores (EEFAS). Los genotipos seleccionados para este trabajo fueron los clones CCH, de plantas provenientes de Cerro Chato, departamento de Florida y el clon C74 de plantas provenientes de una quinta de Salto.

3.2 PREPARACIÓN DE LA PLANTA MADRE

Para establecer el cultivo en condiciones de asepsia, y obtener explantos con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado, se debió mantener las plantas madre bajo condiciones controladas, durante un determinado período de tiempo, en el invernáculo de Facultad de Agronomía. De manera de obtener un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades se les aplicó cada 15 días un fungicida (Benlate®, 2 g L⁻¹), también se controló la nutrición semanalmente con fertilizante soluble PHOSTROGEN® (1,5 g L⁻¹) y se las mantuvo con riego adecuado. La brotación de las plantas madre fue inducida por pre tratamientos con citoquinina de 0,1 g L⁻¹ 6-bencilaminopurina (BAP) cada 15 días hasta que brotaron.

3.3 DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Los explantos de rebrotes con características juveniles fueron colocados en un recipiente con agua para evitar la deshidratación y llevados al laboratorio. Se realizó un lavado con detergente comercial (Deterjane®) y agua corriente para eliminar los contaminantes externos que pudieran existir, manteniendo siempre el material sumergido. Luego se cortaron segmentos nodales conteniendo 1 o 2 nudos cada uno a los que se les quitó $\frac{3}{4}$ partes de la lámina foliar.

La esterilización química se realizó en cámara de flujo laminar, empleando los siguientes materiales: alcohol (70%); hipoclorito de sodio comercial al 10%, Tween 20® como agente emulsionante, ácido cítrico (0,1 g L⁻¹) como antioxidante, agua destilada estéril para la realización de los enjuagues y pinzas y vasos vacíos estériles para la manipulación.

Procedimiento de desinfección 1

Los explantos se colocaron en un recipiente con etanol al 70% y se agitó manualmente por un minuto, para eliminar las burbujas de aire permitiendo al líquido esterilizante entrar en mejor contacto con el material vegetal.

Se tomaron con las pinzas y se sumergieron los mismos en un recipiente con hipoclorito al 5% con una gota de Tween 20[®], agitándolo manualmente durante 10 min y luego se volvió a repetir este procedimiento en otro recipiente conteniendo hipoclorito. Posteriormente se realizaron dos enjuagues con agua destilada estéril y un tercer enjuague con ácido cítrico estéril.

Procedimiento de desinfección 2

Se colocaron los explantos con una pinza en un recipiente con etanol al 70% y el mismo fue colocado en agitador magnético por un minuto. Luego con pinzas se tomaron los explantos y se sumergieron en un recipiente con hipoclorito al 3,3 % colocado en el agitador magnético durante 10 min con una gota de Tween 20[®]. Posteriormente se realizaron dos enjuagues con agua destilada estéril y un tercero con ácido cítrico estéril.

3.4 INTRODUCCIÓN DEL MATERIAL

Una vez concluida la desinfección del material se procedió a la introducción *in vitro* de los explantos. Ambos genotipos fueron introducidos en un medio basal WPM, que fue suplementado con vitaminas MS y también se le agregó sacarosa al (3%), agar (0,7%) y (0,5 g L⁻¹) de PVP.

Cuadro No. 1. Composición del medio Woody Plant Medium (WPM)

| COMPUESTO | CONCENTRACIÓN WPM |
|---|--------------------------|
| NITRATOS | |
| Nitrato de amonio: NH ₄ NO ₃ | 400 mg L ⁻¹ |
| Nitrato de calcio: Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O | 556 mg L ⁻¹ |
| SULFATOS | |
| Sulfato de Magnesio: MgSO ₄ ·7H ₂ O | 370 mg L ⁻¹ |
| Sulfato de Manganeso: MnSO ₄ ·4H ₂ O | 29,43 mg L ⁻¹ |
| Sulfato de Zinc: ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 8,6 mg L ⁻¹ |
| Sulfato de Cobre: CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,25 mg L ⁻¹ |
| HALOGENOS | |
| Cloruro de Calcio: CaCl ₂ ·2H ₂ O | 96 mg L ⁻¹ |
| FOSTATOS | |
| Fosfato de Potasio monobásico: KH ₂ PO ₄ | 170 mg L ⁻¹ |
| Ácido Bórico: H ₃ BO ₃ | 6,2 mg L ⁻¹ |
| Molibdato de Sodio: Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0,25 mg L ⁻¹ |
| HIERRO | |
| Na ₂ EDTA | 37,3 mg L ⁻¹ |
| Sulfato ferroso: FeSO ₄ ·7H ₂ O | 27,8 mg L ⁻¹ |

Fuente: Lloyd y McCown (1981)

Cuadro No.2. Concentraciones de vitaminas del medio Murashig Skoog (MS)

| VITAMINAS | CONCENTRACIÓN MS |
|------------------|------------------------|
| Tiamina | 10 mg L ⁻¹ |
| Acido Nicotínico | 1 mg L ⁻¹ |
| Piridoxina | 1 mg L ⁻¹ |
| Myoinositol | 100 mg L ⁻¹ |

Fuente: Murashige y Skoog (1962)

Se ajustó el pH a 5,8 y luego fue esterilizado en autoclave a 121 °C y una presión de 1,5 Kg cm⁻² durante 20 min. La etapa de introducción se realizó en la cámara de flujo laminar Labotec BBS-SDS.

A cada explanto se le cortó el extremo basal y apical con bisturí estéril y se descartó dicha parte, quedando para introducir el segmento restante, con un nudo donde se encuentra la yema axilar. Cada explanto se colocó individualmente en un tubo de ensayo conteniendo 25 ml de medio WPM suplementado con PVP, cerrado con film transparente de PVC. Los explantos fueron cultivados en la cámara de crecimiento a una temperatura de 24 ± 2°C, con fotoperiodo de 16 horas de luz (lámparas de luz blanca fría fluorescente, con intensidad lumínica de 25 μmolfotones m⁻² s⁻¹).

Los parámetros evaluados en esta etapa fueron sobrevivencia, oxidación y contaminación, según los siguientes cálculos:

$$\text{— Sobrevivencia} = \frac{\text{No. explantos totales} - (\text{bacterias} + \text{hongos} + \text{oxidación} + \text{callo})}{\text{No. explantos totales}} \times 100$$

$$\text{— Oxidación} = \frac{\text{No. explantos oxidados} \times 100}{\text{No. explantos totales}}$$

$$\text{— Contaminación} = \frac{\text{No. explantos contaminados (bacterias + hongos)} \times 100}{\text{No. explantos totales}}$$

3.5 ENSAYO DE MULTIPLICACIÓN

Este ensayo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la zeatina en inducir la proliferación de brotes en el medio de cultivo para ambos clones durante la etapa de multiplicación *in vitro*. Los brotes obtenidos se repicaron al medio WPM suplementado con 1 mg L⁻¹ de zeatina, y se realizaron subcultivos cada 20 días.

Durante esta etapa se realizó la siguiente evaluación:

$$\text{— Tasa de proliferación} = \frac{\text{No. explantos finales a los 20 días de subcultivo}}{\text{No. explantos iniciales}}$$

3.6 ENSAYO DE ENRAIZAMIENTO

Se utilizó explantos individuales de un tamaño aproximado de 2 centímetros. El medio basal utilizado fue WPM, con vitaminas MS, 3% de sacarosa, y 0,7% agar como agente gelificante. Se agregaron promotores de enraizamiento. Se evaluó el efecto del ácido indolbutírico (AIB), el floroglucinol (PG) como protector de la auxina a la oxidación y nitroprusiato de sodio (SNP) como donador de óxido nítrico utilizado a razón de aumentar en respuesta a las auxinas y promover enraizamiento.

En los tratamientos con auxina, los explantos fueron transferidos a un medio de cultivo basal desprovisto de reguladores de crecimiento luego de siete días, para permitir la elongación de las raíces.

Evaluaciones realizadas:

- No. de raíces por planta
- porcentaje de enraizamiento

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño fue factorial considerando dos genotipos y dos tratamientos (desinfecciones).

Descripción de los factores:

genotipos

- Clon C74
- Clon CCH

tratamientos

- T1 = (Desinfección 1) = NaClO al 5% Tiempo 20'
- T2 = (Desinfección 2) = NaClO al 3,3 % Tiempo 10'

El número de repeticiones varió entre 2 y 4 para ambos clones de acuerdo a la disponibilidad del material vegetal de partida. La unidad experimental fue de 10 explantos por tratamiento.

En el ensayo de multiplicación se realizó el experimento bajo un diseño completamente aleatorizado donde se aplicó como tratamiento 1 mg L^{-1} de zeatina para los genotipos C74 y CCH. Se realizaron 17 repeticiones para el clon C74 y 10 repeticiones para el clon CCH, siendo la unidad experimental cada explanto individual.

El diseño estadístico utilizado en el ensayo de enraizamiento fue factorial (2×5), para ambos genotipos con 5 tratamientos cada uno, tres repeticiones para el clon C74 y dos repeticiones para el clon CCH, utilizándose como unidad experimental 10 explantos por tratamiento.

Descripción de los factores:

genotipos

- clon C74
- clon CCH

tratamientos

- T1 = TESTIGO
- T2 = PG 126 mg L^{-1}
- T3 = AIB 2 mg L^{-1}
- T4 = SNP 30 mg L^{-1}
- T5 = PG 126 mg L^{-1} + AIB 2 mg L^{-1}

En este ensayo se utilizó como testigo el medio WPM (Lloyd y McCown, 1981) sin el agregado de compuestos inductores.

Para las variables cuantitativas, el modelo estadístico utilizado en los ensayos de establecimiento y enraizamiento *in vitro* (modelo factorial) tiene la siguiente forma:

$$Y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + d_{ij} + e_{ijk} \quad \text{con } i=1,2; j=1,2; k=1,\dots,n_{ij}$$

Dónde:

Y_{ijk} representa la respuesta de la k -ésima repetición en el i -ésimo nivel del factor A y j -ésimo nivel de factor B,

μ representa una media general,

a_i el efecto que produce el i -ésimo nivel del factor A,

b_j corresponde al efecto del j -ésimo nivel del factor B,

μ_{ij} el efecto adicional (interacción) para la combinación de los niveles i del factor A y j del factor B

ϵ_{ijk} es el error aleatorio asociado a la observación ijk -ésima

Los términos ϵ_{ijk} que usualmente se suponen normal e independiente distribuidos con esperanza cero y varianza común s^2 .

En el ensayo de multiplicación *in vitro* las variables cuantitativas del modelo estadístico (modelo completamente aleatorizado) tiene la siguiente forma:

$$Y_{ij} = \mu + \zeta_j + \epsilon_{ij} \quad i = 1, 2, 3, \dots, \quad j = 1, 2, 3, \dots, n$$

Dónde:

Y_{ij} variable de respuesta del i - ésimo tratamiento en la j - ésima repetición

μ media poblacional

ζ_j efecto del i ésimo tratamiento

ϵ_{ij} error experimental (residual) asociado al i - ésimo tratamiento en la j - ésima repetición

Usualmente se asume que el término de error se distribuye normalmente con media cero y varianza constante para toda observación (Balzarini et al., 2008)

Los resultados obtenidos en los ensayos fueron sometidos a un análisis simple varianza (ANAVA). La comparación de medias se realizó mediante test de Tukey $p < 0,05$ para los ensayos de establecimiento y multiplicación y de enraizamiento. Para dicho análisis se utilizó el software estadístico InfoStat®.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ENSAYO DE ESTABLECIMIENTO

El porcentaje general de sobrevivencia de este ensayo fue bajo. Sobre un total de 311 explantos introducidos, 116 sobrevivieron lo que indicó una sobrevivencia de 37%. Este bajo porcentaje se explica por la alta contaminación presentada por hongos y bacterias (33%), oxidación (22%) y en menor medida, por la presencia de callo (8%).



Figura No.1. Introducción (izquierda- contaminación por bacteria en el clon C74, derecha- presencia de callosidad en explantos en el clon CCH)

La figura No.1 muestra a la (izquierda) la presencia de bacteria para el clon C74, que en este ensayo de introducción para ambos clones fue apenas de un 3%. A la (derecha) se muestra la presencia de callosidad en los explantos en el clon CCH que fue motivo de descarte, en conjunto con los explantos oxidados y contaminados por hongos y bacterias para ambos clones.

Para analizar los resultados obtenidos en este ensayo de introducción según el tipo de desinfección realizada para ambos clones se realizaron las evaluaciones a través de análisis de varianzas.

Cuadro No. 3. Fuentes de variación, grados de libertad y valores de $p < F$ del ANAVA para las variables oxidación, contaminación y sobrevivencia

| Valor $p > F$ | | | | | |
|---------------------|--------------------|-----------|---------------|----------|---------------|
| Fuente de variación | Grados de libertad | Oxidación | Contaminación | | sobrevivencia |
| | | | Hongo | Bacteria | |
| Clon | 1 | 0,198424 | 0,582974 | 0,12221 | 0,870177 |
| Tratam.desinf. | 1 | 0,700085 | 0,304711 | 0,782598 | 0,045660 |
| Clon x tratam. | 1 | 0,889756 | 0,076778 | 0,415802 | 0,645944 |
| C.V. (%) | | 82,79 | 70,85 | 109,99 | 56,1 |
| Media | | 23.23 | 30.23 | 2.77 | 35.31 |

Como se observa en el cuadro No. 3, no existieron diferencias significativas entre tratamientos de desinfección, tampoco existieron diferencias significativas entre clones ni interacción clon *desinfección para las variables oxidación y contaminación.

La sobrevivencia varió entre tratamientos ($p = 0,0457$), por lo tanto existe al menos un tratamiento con efecto diferente. No se encontró diferencias significativas por clon, ni interacción clon* desinfección. Por lo tanto, no existió un comportamiento superior de un clon en un determinado tratamiento.

4.1.1 Sobrevivencia

Existieron diferencias significativas entre los tratamientos por consiguiente se procedió a realizar el contraste de medias. De acuerdo al mismo (Tukey $p < 0,05$) el tratamiento 2 (T2) presentó mayor sobrevivencia. De acuerdo a lo mencionado sería recomendable ajustar la concentración de hipoclorito al 3,3 % durante 10 minutos para ambos genotipos para mejorar la supervivencia en esta especie.

Cuadro No. 4. Sobrevivencia promedio por tratamientos de desinfección (Tukey, $p < 0,05$)

| Desinfección | Sobrevivencia | No. explantos | E.E. | |
|--------------|---------------|---------------|------|---|
| T 2 | 45,74 | 174 | 7,00 | A |
| T 1 | 19,32 | 137 | 9,04 | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Como se observa en el cuadro No.4, el tratamiento que logro obtener mayor porcentaje de sobrevivencia fue el de menor concentración del desinfectante y tiempo de inmersión. Según Mroginski y Roca (1991) cuando se aumenta la concentración y el

tiempo de exposición disminuye la contaminación pero puede afectar la viabilidad, por provocar daños en los tejidos celulares, necrosis y muerte celular. Esto puede deberse principalmente a la toxicidad del agente desinfectante incrementado por mayor concentración y tiempo de exposición. Por otro lado estos autores refieren que es conveniente utilizar desinfectantes como el hipoclorito de sodio, en tiempos no mayores de 10 min ya que sería el tiempo suficiente para eliminar microorganismos sin provocar mayores daños a los tejidos superficiales.

4.1.2 Oxidación

El establecimiento *in vitro* especialmente de especies leñosas, está, en gran medida, limitado por la ocurrencia de oscurecimientos y necrosis de los tejidos en los explantos y en el medio de cultivo. En tal sentido, era esperable encontrar explantos oscurecidos por oxidación de compuestos fenólicos que en este ensayo resultó en un 22%. Como se muestra en el cuadro No. 3, no existieron diferencias significativas en la oxidación de los explantes entre desinfecciones y tampoco existió diferencias significativas entre clones. Por consiguiente no se logró reducir la oxidación de los explantos como se esperaba bajando el tiempo de exposición y concentración del agente desinfectante.



Figura No. 2. Presencia compuestos de fenólicos en medio de cultivo y explantos en el clon C74

Esto constituye uno de los problemas más serios y frecuentes, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro* (George, 1996). El mejor procedimiento para impedir el desencadenamiento de eventos que conlleven a la

oxidación de los explantos es la prevención y disminución de las circunstancias que provocan o estimulan el estrés oxidativo en los explantos.

Teniendo en cuenta que fueron previstas distintas maneras de evitar oxidación al momento de la introducción con aplicación de PVP en el medio de cultivo y la colocación de los explantos después de los enjuagues en ácido cítrico, se obtuvo un 22% de explantos oxidados.

Existen varios elementos que pueden desencadenar estrés oxidativo como contaminantes microbianos, lesiones, sustancias abrasivas del agente desinfectante. Las lesiones generadas al hacer la escisión de los explantos a menudo promueve la liberación de polifenoles, generando oscurecimiento en los medios de cultivo y en los tejidos del explanto. El porcentaje de oscurecimiento es consecuencia de la oxidación de los compuestos fenólicos presentes producto de la reacción de enzimas como las polifenol oxidases que inducen la producción de exudados oscuros en el medio de cultivo.

También puede deberse a la elección no correcta de la concentración del desinfectante y/o al tiempo de inmersión en el desinfectante no ser el más apropiado para disminuir la oxidación en esta especie. Como también la alta contaminación presente en los explantos en el ensayo principalmente por hongos pudo haber generado un estrés que desencadene oxidación provocando ennegrecimiento en los medios de cultivo y en los tejidos del explanto.

Una consideración futura a tener en cuenta es el manejo de la irradiancia para reducir oxidación de fenoles. Según Marks y Simpson (1990), la oxidación en plantas leñosas, puede ser controlada por los niveles de irradiación recibidos por las plantas madres, debido a que la actividad de muchos sistemas enzimáticos que participan en la síntesis y oxidación de los fenoles, es inducida por la luz. En este sentido, George (1996) indica que la oxidación del explante puede ser evitada o reducida si éste se toma de plantas donadoras que han crecido en oscuridad total, con intensidad de luz baja o incluso en días cortos.

4.1.3 Contaminación

Existió en ambos tratamientos de desinfecciones de los materiales alto porcentaje de contaminación. Hubo más contaminación por hongos (30%), que por bacterias (3%) para ambos clones.

Como muestra el cuadro No.3, no existieron diferencias significativas entre desinfecciones y tampoco existió diferencias significativas entre clones. Por consiguiente no se logró disminuir significativamente la contaminación por hongos ni

por bacterias en los explantos variando el tiempo de desinfección y la concentración del desinfectante.

Resultados mejores fueron obtenidos por Ross y Grasso (2010), lograron un porcentaje de contaminación menor al 20% con 2% de hipoclorito de sodio en un tiempo de inmersión de 20 min para ambos clones. En este mismo ensayo existió claramente un efecto clon entre los genotipos estudiados que se contradice con lo obtenido en este ensayo que no presentó diferencias significativas entre clones.

En el invernáculo a las plantas madres se le aplicó fungicida y se limpió las hojas con alcohol pero, aun así, y después de la desinfección con hipoclorito de sodio y alcohol ambos clones presentaron alto porcentaje de contaminación (33%). Es posible que las irregularidades que presentaban los explantos en la superficie y vellosidad impliquen que se alojen bacterias, esporas de hongos, polvo u otros, impidiendo la eficiente penetración del desinfectante.

Por otro lado la infección por hongos y bacterias puede provenir de la planta madre de su (exterior o su interior), del medio nutritivo, del aire y/o de una inadecuada manipulación de los explantos al momento de la introducción del material.

Los métodos de desinfección utilizados no siempre eliminan las poblaciones de microorganismos asociadas a los tejidos de las plantas *in vivo*, muchos son capaces de permanecer latentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores y quedan protegidos de los agentes químicos. De esta forma, se introducen en el cultivo de tejidos, se propagan con el material vegetal y pueden permanecer sin expresarse en los medios de cultivo por largos periodos de tiempo (Alvarado, 1998). Las bacterias son consideradas como los contaminantes más comunes y las que ocasionan los problemas más importantes, ya que pueden ser sistémicas y su detección es más difícil. Sin embargo, en el presente ensayo el porcentaje por contaminación por bacteria fue relativamente bajo.

Como se ha reiterado, los microorganismos pueden ser introducidos en el laboratorio, sin embargo, en muchos casos es difícil distinguir entre microorganismos asociados a las plantas e introducidos en el laboratorio y determinar la fuente exacta de contaminación. Para ambas desinfecciones realizadas no se logró obtener plantas libres de contaminantes ni con mayor concentración de desinfectante y tiempo de exposición, ni con la disminución concentración y exposición del agente desinfectante.

Una recomendación a tener en cuenta según Mroginski y Roca (1991) es el uso de fungicidas y antibióticos posterior a los enjuagues, o antes de la introducción de los explantos, para que éstos queden impregnados de dichos productos y puedan actuar sobre los contaminantes.

En este ensayo se concluye que se ajusta mejor para esta especie utilizar una concentración de 3,3% de hipoclorito de sodio durante 10 minutos para la desinfección, permitiendo de manera más exitosa el establecimiento a las condiciones *in vitro* con mejores porcentajes supervivencia. Por otro lado no se observó un efecto clon que permita un establecimiento mejor al medio de introducción WPM con vitaminas MS y 0,5 g L⁻¹ PVP. La introducción de los explantos al medio de cultivo es una etapa crítica en el proceso de micropropagación ya que se puede perder un número significativo de material.

4.2 ENSAYO DE MULTIPLICACIÓN

Se analizó tasa de proliferación de brotes para ambos clones en medio WPM suplementado con 1 mg L⁻¹ de zeatina.

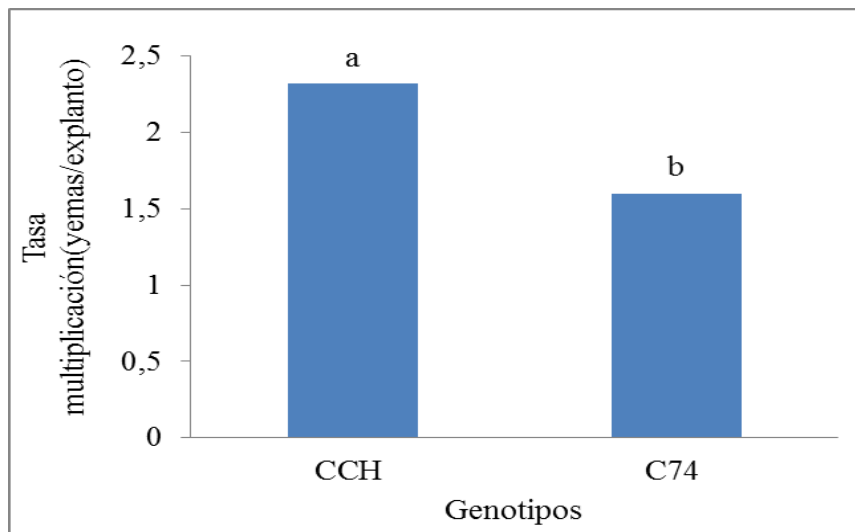


Figura No. 3. Explantos del clon C74 en medio WPM con 1 mg L⁻¹ de zeatina puestos a multiplicar ya brotados

Cuadro No. 5. Fuentes de variación, grados de libertad y valores de $p < F$ del ANAVA para la variable proliferación de brotes

| Fuente de variación | Grados de libertad | Valor $p > F$ | C.V. (%) | Media |
|---------------------|--------------------|---------------|----------|-------|
| Clon | 1 | 0,035201 | 43,46 | 1,87 |

El valor $p = 0,0352$ del ANAVA sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias. De acuerdo a la prueba Tukey el clon CCH presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto al clon C74. Este resultado demuestra que el efecto de la zeatina en este estudio tuvo efecto significativo sobre el crecimiento y desarrollo de los brotes en ambos clones. Siendo el clon el CCH el que presentó mayor respuesta en agregado de zeatina obteniendo mayor tasa de proliferación de brotes como se muestra en la figura siguiente.



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura No. 4. Tasa de proliferación de yemas según genotipos en medio WPM con el agregado de 1 mg L^{-1} zeatina.

Ross y Grasso (2010) evaluaron la tasa de multiplicación en Guayabo del país con diferentes tratamientos hormonales (tipo y concentración de citoquinina) para los clones CCH y C74. Observaron una tendencia del clon CCH a tener una tasa de multiplicación mayor comparada con el genotipo C74 para todos los tratamientos realizados. Esta tendencia fue similar en este ensayo, obteniéndose una tasa de multiplicación 2,31 para el clon CCH y 1,61 para el clon C74 con el empleo de 1 mg L^{-1} zeatina. Sin embargo un estudio realizado por Castillo et al. (2015) en diferentes clones de esta especie y en concentraciones levemente menores de zeatina generó proliferación de brotes de manera independientes del genotipo.

En el presente estudio la tasa de multiplicación fue menor a la obtenida por otros autores. Ross y Grasso (2010) con la aplicación de otras citoquininas BAP o 2iP (2 - isopenteniladenina) reportaron en promedio 4,1 yemas para el clon CCH y 3,4 para el clon C74, las tasas de multiplicación más altas obtenidas con los mismos genotipos podría estar determinada por el tipo de citoquinina aplicada. Castillo et al. (2015)

obtuvieron en concentraciones levemente menores de zeatina tasas de multiplicación del orden de 4 para otros genotipos de esta especie, no existió diferencia por genotipo en ese trabajo, lo que podría estar marcando la diferencia con este ensayo es la concentración de zeatina utilizada por los autores que fue levemente menor, o los diferentes genotipos evaluados. Otros autores Mitrofanova y Mitrofanova (2004) estudiaron el efecto de BAP y zeatina con numerosas concentraciones de las mismas en Guayabo del país . Obtuvieron un número promedio de brotes que varió en el rango de (0 a 1,8) con BAP y en el rango de (1,7 a 3,7) con zeatina aumentando el número de brotes conjuntamente con el aumento de la concentración de esta última. En concentraciones iguales de zeatina a este ensayo obtuvieron un resultado más alto ya que en promedio se obtuvo 3.1 brotes por explanto pudiendo variar el resultado por el genotipo utilizado.

4.3 ENSAYO DE ENRAIZAMIENTO

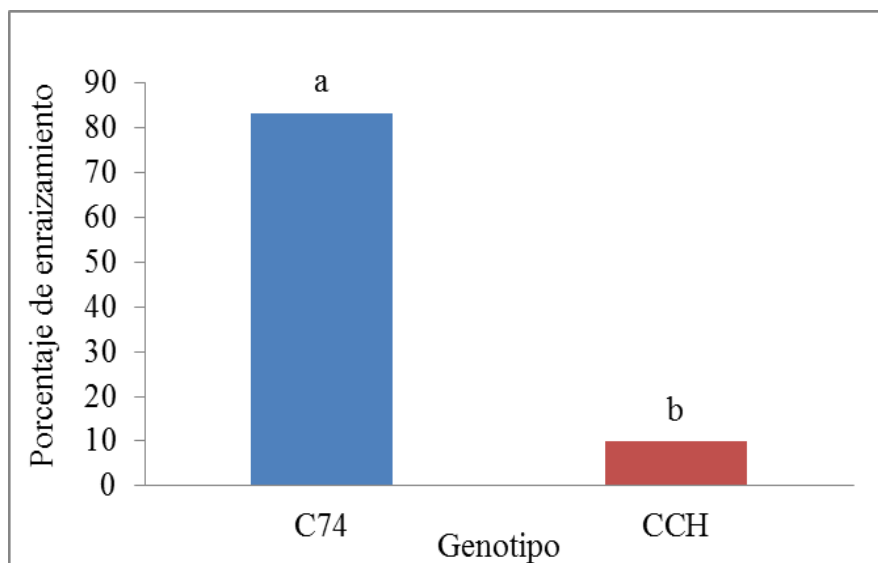
En este ensayo fue insignificante la contaminación por hongos y bacterias, se observó en un gran número de microestacas enraizadas una proliferación callosa en la base de las mismas. En este ensayo se evaluó el porcentaje de enraizamiento y número de raíces generadas por micro estaca. Para las variables evaluadas se encontró diferencias significativas entre clones, pero no se encontró diferencias significativas entre tratamientos inductores de enraizamiento ni tampoco fue significativa la interacción.

Cuadro No.6. Fuentes de variación, grados de libertad y valores de $p < F$ del ANAVA para las variables porcentaje de enraizamiento y número de raíces/estaca.

| Valor $p > F$ | | | |
|---------------------|--------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Fuente de variación | Grados de libertad | Enraizamiento | |
| | | Porcentaje de enraizamiento | Número de raíces/estaca |
| Clon | 1 | <0,0001 | <0,0001 |
| Tratamientos | 4 | 0,228229 | 0,671316 |
| Clon x Tratam. | 4 | 0,882018 | 0,555623 |
| CV. (%) | | 30,42 | 47,64 |
| Media | | 53,96 | 1,37 |

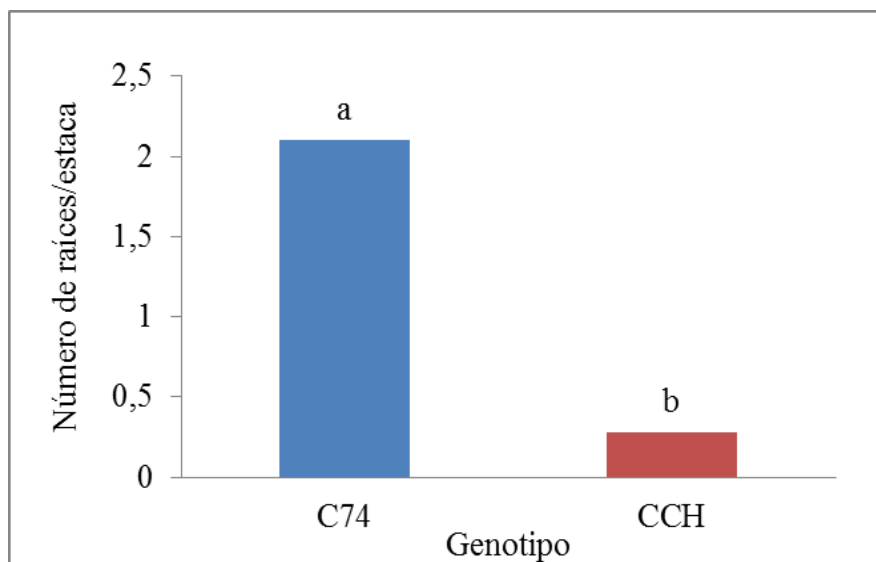
El clon C74 en promedio obtuvo 83 % de enraizamiento comparado con el clon CCH que apenas produjo en promedio 10% de enraizamiento. El clon C74 en promedio obtuvo 2,11 de raíces/estaca comparado con el clon CCH que apenas produjo en promedio 0,28 raíces/estaca. Este resultado muestra que existe un efecto clon significativo en el número de explantos enraizados y en el número de raíces/estaca.

Ambos clones estuvieron bajo las mismas condiciones controladas de luz, temperatura, y fotoperiodo y fue utilizado el mismo tipo de medio cultivo, con las mismas concentraciones de compuestos inductores y fue casi nulo el descarte por contaminación de hongos y bacterias para ambos clones. Por todo lo mencionado anteriormente se deduce el genotipo está fuertemente ligado con la capacidad de producir raíces, existiendo un efecto clon determinante de la capacidad de enraizamiento que se muestra en la gran diferencia obtenida en la producción de raíces entre los clones evaluados.



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura No. 5. Resultados de prueba de comparación de medias de Tukey ($p > 0,05$) para porcentaje de enraizamiento por genotipo.



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura No. 6. Resultados de prueba de comparación de medias de Tukey ($p > 0,05$) para número de raíces/estaca por genotipo.



Figura No. 7. Enraizamiento del clon C74 en medio WPM sin hormonas

En cuanto a los tratamientos utilizados como inductores de enraizamiento no se encontró diferencias significativas, ni interacción clon* tratamiento para las variables porcentajes de enraizamiento y número de raíces/explantos.

Es sabido que la auxina, natural o aplicada artificialmente, es un requerimiento para la iniciación de raíces adventicias en presencia de auxina, ya sea exógena o endógena (Hartmann y Kester, 1998). Las auxinas favorecen la formación de raíces adventicias porque modifican la extensibilidad celular, al producir factores que ablandan la pared. Es conocida la capacidad de la auxina en estimular la división de las células, parenquimáticas cerca de los tejidos vasculares promoviendo la formación de raíces adventicias, como también promover la formación de raíces laterales (Squeo y Cardemil, 2006). Sin embargo, en el presente ensayo no existió un efecto significativo frente al agregado de auxina ni tampoco de auxina junto al floroglucinol. Estos resultados difieren con otros estudios realizados por los autores Bhojwani et al. (1987), Bassi y Cossio (1993), Oltramari et al. (2000), Ross y Grasso (2010) que destacan a la auxina (AIB) como inductora del enraizamiento adventicio de manera significativa en Guayabo del país. A modo analizar posteriormente el tratamiento con AIB con los autores anteriormente mencionados se promedió los enraizamientos de ambos clones.

Los autores Bhojwani et al. (1987) obtuvieron mayores tasas de enraizamiento comparado con este ensayo cuando utilizaron AIB como tratamiento en todas las concentraciones analizadas. Utilizaron AIB en concentraciones de (0,1 mg L⁻¹; 0,5 mg/L⁻¹, 1 mg L⁻¹) obteniendo 85 %, 58%, y 68% de enraizamiento respectivamente. Los autores observaron una reducción del enraizamiento con un incremento en la concentración de auxina. En el presente estudio con concentraciones mayores de AIB (2 mg L⁻¹) se obtuvo apenas un porcentaje de 49% de enraizamiento. Este resultado ratifica que un aumento en la concentración de AIB genera una reducción del enraizamiento. Por otro lado, los valores bajos obtenidos en este ensayo con AIB podrían diferir por el medio de cultivo basal empleado, la edad de las plantas madres que en éste ensayo fueron mayores. Como también las diferencias pueden estar dadas por los genotipos de esta especie utilizados independientemente de agregado de auxina.

Resultados mejores fueron obtenidos por Bassi y Cossio (1993) resultando en un 61% de enraizamiento utilizando medio WPM, con (0,5 mg L⁻¹). Con una concentración de (1 mg L⁻¹) de AIB generó un menor porcentaje (37 %) de enraizamiento, reafirmando el concepto de Bhojwani et al. (1987) que en concentraciones mayores de AIB el enraizamiento disminuye. Sin embargo si se compara con este ensayo con (2 mg L⁻¹) AIB el enraizamiento generado fue mayor (49%), esto puede deberse al tiempo que se dejó las plántulas en AIB por estos autores o podría deberse al genotipo utilizado. Los mismos lograron obtener 1-2 raíces por planta en ambas concentraciones. Esta información es consistente con la obtenida en este ensayo que se obtuvo en promedio para ambos clones 1,2 raíces por estaca pero con una concentración más alta de AIB.

Resultados mejores de enraizamiento fueron obtenidos por Oltramari et al. (2000), quienes observaron que en 6 días con AIB (20 μM) en medio de cultivo basal WPM se logró obtener un porcentaje de enraizamiento de 68,9% con 1,5 de raíces por estaca. Observaron que en más días con AIB provocaba disminución enraizamiento. Sin embargo, Ross y Grasso (2010) obtuvieron menores porcentajes de enraizamiento (44%) cuando utilizaron menor concentración de AIB (9,8 μM) luego de 7 días en medio de cultivo MS. Esta diferencia podría estar dada por los genotipos o por el medio de cultivo utilizado. En el presente ensayo el enraizamiento fue mayor en concentraciones similares de AIB en relación a estos últimos autores, esto podría deberse al genotipo o al medio de cultivo empleado (medio MS), atribuyendo que las especies leñosas para el crecimiento y morfogénesis prefieren concentraciones bajas de sales.

Los resultados de enraizamiento de los ensayos analizados varían entre sí según la concentración utilizada auxina, por el tiempo de exposición a la misma, también estos resultados podrían estar variando por la edad de las plantas madres utilizadas, por el medio cultivo, y/o simplemente por el genotipo utilizado. Si bien en este ensayo no fue significativa la aplicación de auxina se podría seguir probando diferentes concentraciones que se ajusten mejor para el Guayabo del país o para a cada genotipo de guayabo. Haciendo referencia a los numerosos trabajos en esta especie que muestran a la auxina como inductora de enraizamiento. Claramente en este ensayo existieron diferencias significativas por genotipo, cada clon tiene una capacidad de generar raíces diferente y la aplicación de auxina a determinados genotipos podría potenciar el enraizamiento en ciertos clones haciendo referencia a los trabajos analizados.

Cabe aclarar que este ensayo no se observó que la auxina promoviera el enraizamiento según el genotipo, siendo el genotipo el que determinó la capacidad de producir raíces. Habría que determinar qué es lo que determina en cada genotipo la capacidad inherente de producir raíces o que obstaculiza el proceso de producción de raíces adventicias a ciertos genotipos. También cabe recalcar que las auxinas sufren de oxidación por actividad de las peroxidasas vegetales pudiendo disminuir el enraizamiento. Los difenoles y los polifenoles inhiben el proceso sin embargo en este ensayo no se observó un efecto de floroglucinol significativo en disminuir la oxidación.

En la bibliografía consultada no se encontraron estudios anteriores que muestren al floroglucinol y al nitroprusiato de sodio como inductores de enraizamiento en Guayabo del país. Existen trabajos en otras especies como en varios géneros de ciertas familias como Rosáceas, Rubiáceas, Malváceas, Solanáceas y Moráceas (Pontikis y Melaza, citados por George 1993, Hammatt 1993, Sarkar y Naik 2000) que muestran la capacidad del floroglucinol de promover el enraizamiento como protector de la auxina a la oxidación y del nitroprusiato de sodio como donador de óxido nítrico promoviendo aún más el enraizamiento como en *Cucumis sativus* (Pagnussat et al., 2002), *Lycopersicon esculentum* Mill. (Correa-Aragunde et al., 2004), *Malus hupehensis* Rehd

(Gao y Yang, 2011) y *Arabidopsis thaliana* (Fernández Marcos et al., 2011). Si bien existen numerosos trabajos como se mencionó anteriormente, no se encontró el efecto esperado con el agregado de floroglucinol, ni con el agregado nitroprusiato de sodio en los clones evaluados, no presentando diferencias significativas con respecto al testigo.

El enraizamiento generado en el medio sin el agregado de compuestos inductores fue en promedio 61%. Este valor no difiere del observado con el agregado de compuestos inductores. Por lo tanto, no se justificaría la utilización de los mismos para promover el enraizamiento en esta especie.

5. CONCLUSIONES

El establecimiento del cultivo *in vitro* fue una etapa limitante por la alta contaminación generada principalmente por hongos, que implicó varias introducciones para obtener el número de explantos deseados para el ensayo de enraizamiento. De las desinfecciones evaluadas, el tratamiento T2 (3,3% de hipoclorito de sodio en un tiempo de exposición de 10 min) fue el que presentó mayor porcentaje de sobrevivencia de explantos.

La zeatina tuvo efecto significativo sobre el crecimiento y desarrollo de los brotes en ambos clones. Existió diferencias entre genotipos, el clon CCH fue el que presentó mayor respuesta en agregado de zeatina, aunque las tasas de multiplicación fueron menores a las obtenidas por otros autores.

El porcentaje de enraizamiento no varió entre tratamientos. En el ensayo no existieron diferencias para ninguno de los compuestos evaluados. Si existió diferencia marcada por genotipo, el clon C74 en promedio obtuvo 83% de enraizamiento generando 2,11 de raíces/estaca comparado con el clon CCH que apenas produjo en promedio 10% de enraizamiento con 0,28 raíces/estaca. Los resultados sugieren en este ensayo que el genotipo es el principal determinante de la capacidad de enraizamiento en *Acca sellowiana*.

6. RESUMEN

El Guayabo del país (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret) es una especie frutal nativa que presenta alto potencial agronómico y comercial. La apuesta al desarrollo del cultivo en Uruguay se justifica por el éxito de la especie en otros lugares del mundo y por la necesidad de diversificar la oferta frutícola. Es una especie predominantemente alógama y la gran limitante hasta el presente ha sido gran variabilidad de genotipos en cultivo. Por consiguiente, se planteó la necesidad de propagarla vegetativamente de materiales seleccionados, pero el bajo éxito alcanzado implica una limitación importante para la producción con fines comerciales. En estas circunstancias la micropropagación se ha considerado una alternativa a la producción de alta calidad y libre de patógenos. El objetivo general de este trabajo fue ajustar un protocolo de micropropagación a partir de materiales preseleccionados por el Programa de Frutales Menores. Los genotipos seleccionados para este trabajo fueron los clones CCH, de plantas provenientes de Cerro Chato (Florida) y el clon C74 de plantas provenientes de una quinta de Salto de 4-6 años de edad. Cumpliendo con el objetivo de establecer un protocolo, a las plantas madres se les aplicó 6-bencilaminopurina (BAP) $0,1 \text{ g L}^{-1}$ cada 15 días para la producción de brotes juveniles en condiciones de invernáculo. Los explantos utilizados fueron obtenidos de segmentos nodales de tallo de brotes jóvenes y el medio de cultivo empleado en todas las etapas fue WPM suplementado con vitaminas MS, sacarosa (3%) y agar (0,7%). En la etapa de introducción se le agregó al medio ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) del antioxidante PVP, la desinfección del material fue realizada con hipoclorito de sodio al 3,3% y 5% durante (10 y 20) min respectivamente; para la multiplicación del material se suplementó el medio WPM con 1 mg L^{-1} zeatina. Con el fin de evaluar el enraizamiento al medio de cultivo se le agregó según el tratamiento (126 mg L^{-1}) de PG, (2 mg L^{-1}) de AIB, (30 mg L^{-1}) de SNP y (126 mg L^{-1}) de PG junto con (2 mg L^{-1}) AIB. Los resultados obtenidos en la etapa de introducción, el tratamiento que generó mayor cantidad significativa de plantas viables fue NaClO al 3,3% durante 10 min. El porcentaje de multiplicación varió entre clones, el clon CCH generó significativamente mayor proliferación de yemas (2,3) que C74 frente al agregado 1 mg L^{-1} zeatina. La tasa de multiplicación obtenida fue baja para ambos clones respecto a la información reportada por otros autores. No se observaron diferencias en porcentaje de enraizamiento con el agregado de floroglucinol, ácido indol butírico y nitroprusiato de sodio. No obstante se evidenció un efecto clon, lográndose un 83% de explantos enraizados con (2,11 raíces por estaca) en el clon C74 y un 10% de enraizamiento con (0,28 raíces por estaca) en el clon CCH. La información sugiere que la capacidad de rizogénesis en esta especie es altamente dependiente del genotipo.

Palabras clave: *Acca sellowiana*; *In vitro*; Micropropagación.

7. SUMMARY

The Guayabo del país (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret) is native fruit specie that presents high agronomic and commercial potential. Best crop development in Uruguay is justified by the success in other places in the world and the need to diversify the fruit supply. The Guayabo del país, being a predominantly cross pollinated specie, its greatest limitation to the present has been the great variability of crop genotypes. Therefore the need to propagate in a vegetative form, of selected materials, but the low success obtained limited commercial purposes. In these circumstances micro propagation production has been considered as a high quality free from material pathogen alternative. The objective of this work is to set a micropropagation protocol from material short listed by the small fruits program of Facultad de Agronomía (EEFAS). Genotypes selected for this work were the CCH clone, from plants of Cerro Chato (Florida) and the clone C74 of a farm of Salto, both of them of 4 to 6 years old. The explants used were obtained from nodal stem segments of young shoots and the culture medium used in all stages was WPM supplemented with MS vitamins, sucrose (3%) and agar (0,7%). In the introduction stage ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) of the antioxidant PVP was added to the medium, the disinfection of the equipment was carried out with sodium hypochlorite 3,3% and 5% over (10 and 20) min respectively; to the multiplication of the material the WPM medium was supplemented with 1 mg L^{-1} zeatin. In order to evaluate the rooting of the culture medium was added (126 mg L^{-1}) PG (2 mg L^{-1}) of AIB, (30 mg L^{-1}) and SNP (126 mg L^{-1}) PG together with (2 mg L^{-1}) AIB according to treatment. In the results obtained in the introduction stage, the treatment that generated most significant amount of viable plants was NaClO 3.3% for 10 minutes. The multiplication rate varied between clones, the CCH clone generated significantly a major proliferation of buds (2, 3) in opposition to C74 that added 1 mg L^{-1} zeatin. The multiplication rate obtained was low for both clones comparing to the information reported by other authors. No differences in rooting percentage with the addition of phloroglucinol, butyric acid and indole sodium nitroprusside were observed. However a clone effect was evident, achieving 83% of explants rooted with (2, 11 roots per microcutting) in clone C74 and 10% rooting with (0, 28 roots per microcutting) in CCH. The data suggests that the ability to rooting in this specie is highly dependent on the genotype.

Keywords: *Acca sellowiana*; *In vitro*; Micropropagation.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdelnour-Esquivel, A.; Escalant, J. V. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Turrialba, Costa Rica, CEE/CATIE/CIRAD. 38 p.
2. Abu-Abied, M.; Szwedzszarf, D.; Mordehaev, I.; Levy, A.; Stelmakh, O.R.; Yaniv, Y.; Uliel, S.; Katzenellenbogen, M.; Riov, J.; Ophir, R.; Sadot, E. 2012. Microarray analysis revealed up regulation of nitrate reductase in juvenile cuttings of *Eucalyptus grandis*, which correlated with increased nitric oxide production and adventitious root formation. *The Plant Journal*. 71: 787-799.
3. Alvarado, Y. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. In: Pérez Ponce, J. N. ed. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara, Cuba, Instituto de Biotecnología de las Plantas. cap. 5, pp. 81-104.
4. Azcón-Bieto, J.; Talón, M. 2008. Fundamentos de fisiología vegetal. 2 a. ed. Madrid, McGraw-Hill. pp. 377-445.
5. Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*. 20(1): 153-175.
6. Balzarini, M. G.; González, L. A.; Tablada, E. M.; Casanoves, F.; Di Rienzo, J. A.; Robledo, C. W. 2008. InfoStat versión 2008. Córdoba, AR, Universidad Nacional de Córdoba. FCA. Grupo InfoStat. 334 p.
7. Bassi, G.; Cossio, F. 1993 Risultati di ricerche sulla micropropagazione della feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg.). *L'informatore Agrario*. 569: 79-80.
8. Bhojwani, S. S.; Mullins, K.; Cohen, D. 1987. Micropropagation of *Feijoa sellowiana* Berg. *Acta Horticulturae*. no.212: 69-73.
9. Bontempo, P.; Mita, L.; Miceli, M.; Doto, A.; Nebbioso, A.; De Bellis, F.; Conte, M.; Minichiello, A.; Manzo, F.; Carafa, V.; Basile, A.; Rigano, D.; Sorbo, S.; Castaldo, R.; Schiavone, E. M.; Ferrera, F.; De Simone, M.; Vietri, M. T.; Cioffi, M.; Sica, V.; Bresciani, F.; Lera, A.; Altucci, L.; Molinari, A. M. 2007. *Feijoa sellowiana* derived natural Flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 39: 1902-1914.

10. Cabrera, D.; Rodríguez, P.; Vignale, B.; Mara, V. 2010. Avances en la propagación vegetativa de Guayabo del país , (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). In: Encuentro Nacional sobre Frutos Nativos (5°. , 2010, Salto Grande, Salto, UY). Resúmenes. Montevideo, INIA. pp. 43-47 (Actividades de Difusión no. 602).
11. _____.; Vignale, B.; Rodríguez, P. 2014. Propagación vegetativa de materiales preseleccionados de Guayabo del país (*Acca selowiana* (Berg) Burret) en Uruguay. In: Congreso Nacional de Horti-Fruticultura (13°. , 2014, Montevideo, UY). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 49-50.
12. Cacioppo, O. 1988. La Feijoa. Madrid, Mundi-Prensa. 85 p.
13. Castillo, A.; Cabrera, D.; Rodríguez, P.; Zoppolo, R. 2015. Avances en micropropagación de Guayabo del país. In: Encuentro Nacional sobre Frutos Nativos (7°. , 2015, La Estanzuela, Colonia, UY). Resúmenes. Montevideo, INIA. pp. 9-13 (Actividades de Difusión no. 745).
14. Correa-Aragunde, N.; Graziano, M.; Lamattina, L. 2004. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*. 218(6): 900-905.
15. Cunda, J. N. 2006. Caracterización de plantas de “Guayabo del país ” (*Acca sellowiana* (Berg) Burret) desde un enfoque frutícola. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 105 p.
16. Davies, P. 1997. Desarrollo. Montevideo. Facultad de Agronomía. 28 p.
17. Debergh, P. C.; Maene, L. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae*. 14: 335-345.
18. _____.; Read, P. E. 1991. Micropropagation. In: Debergh, P. C.; Zimmerman, R. H. eds. Micropropagation; technology and application. London, Kluwer. cap. 1, pp. 1-13.
19. De Klerk, G. J.; Guan, H.; Huisman, P.; Marinova, S. 2011. Effects of phenolic compounds on adventitious root formation and oxidative decarboxylation of applied indoleacetic acid in *Malus* «Jork 9». *Plant Growth Regulation*. 63(2): 175-185.

20. Dos Santos, K. L.; Peroni, N.; Guries, R. P.; Nodari, R. O. 2009. Traditional knowledge and management of feijoa (*Acca sellowiana*) in Southern Brazil. *Economic Botany*. 63: 204-214.
21. _____; Siminski, A.; Ducroquet, J. P. H. J.; Guerra, M. P.; Peroni, N.; Nodari, R. O. 2011. *Acca sellowiana*; *Goiabeira-serrana*. In: Coradin, L.; Siminski, A.; Reis, A. eds. *Especies nativas da flora brasileira de valor económico atual ou potencial; plantas para o futuro -Região Sul*. s.n.t. cap. 5, pp.111-129.
22. Duarte, O. R.; Fachinello, J. C.; Santos Filho, B. G. 1992. Multiplicação da *goiabeira serrana* através de estacas semilenhosas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* (Brasília). 27(3): 513-516.
23. Ducroquet, J-P. H. J.; Rodrigues Hickel, E.; Nodari, R. O. 2000. *Goiabeira-Serrana (Feijoa sellowiana)*. Jaboticabal, FUNEP. 66 p. (Serie Frutas Nativas no. 5).
24. Fachinello, J. C.; Nachtigal, J. C. 1992. Propagação da *Goiabeira serrana (Feijoa sellowiana)* Berg, a través da mergulhia de cepa. *Scientia Agrícola* (Piracicaba). 49(1): 37-39.
25. _____; Hoffmann, A.; Nachtgal, J. C.; Kersten, E.; Fortes, G. R. 1994. *Propagação de plantas frutíferas de clima temperado*. Pelotas, RS, Editora Universitaria. 179 p.
26. Fernández-Marcos, M.; Sanz, L.; Lewis, D. R.; Muday, G. K.; Lorenzo, O. 2011. Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(45): 18506-18511.
27. Figueiredo, S. L. B.; Kersten, E.; Schuch, M. W. 1995. Efeito do estiolamento parcial e do ácido indolbutírico (IBA) no enraizamento de estacas de ramos de *goiabeira serrana (Feijoa sellowiana, Berg)*. *Scientia Agrícola* (Piracicaba). 52 (1):167-171.
28. Fischer, G.; Miranda, D.; Cayón, G.; Mazorra, M. 2003a. *Cultivo, poscosecha y exportación de la Feijoa (Acca sellowiana Berg)*. Bogotá, Produmedios. 152 p.

29. _____. 2003b. Ecofisiología, crecimiento y desarrollo de la feijoa. In: Fischer, G.; Miranda, D.; Cayón, G.; Mazorra, M. eds. Cultivo, poscosecha y exportación de la Feijoa (*Acca sellowiana* Berg). Bogotá, Produmedios. cap. 1, pp. 9-25.
30. Franzon, R. C.; Antunes, L. E. C.; Raseira, M. do C. B. 2004. Efeito do AIB e de diferentes tipos de estaca na propagação vegetativa da Goiabeira- Serrana (*Acca sellowiana*. Berg). *Revista Brasileira Agrociencia*. 10(4): 515-518.
31. Gao, H. J.; Yang, H. Q. 2011. Nitric oxide effect on root architecture development in *Malus* seedlings. *Plant, Soil and Environment*. 57(9): 418-422.
32. George, E. F. 1993. *Plant propagation by tissue culture in practice*. 2nd. ed. Wageningen, The Netherlands, Exergetic. pt.1, pp. 429-431.
33. _____. 1996. *Plant propagation by tissue culture in practice*. 2nd. ed. Wageningen, The Netherlands, Exergetic. pt.2, pp. 571-583.
34. _____.; Hall, M. A.; De Klerk, G. 2008. *Plant propagation by tissue culture*. Amsterdam, Springer. 504. p.
35. _____.; _____.; _____. 2010. *Plant propagation by tissue culture*. 3rd. ed. Amsterdam, Springer. pp. 33-205.
36. Grattapaglia, D.; Machado, M. 1998. Micropropagação. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. eds. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, Brasil, EMBRAPA/SPI. cap.3, pp. 183-260.
37. Hammatt, N. 1993. Promotion by phloroglucinol of adventitious root formation in micropropagated shoots of adult wild cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Growth Regulation*. 14(2): 127-132.
38. Hartmann, H. T.; Kester, D. E. 1998. *Propagación de plantas; principios y prácticas*. 6ª reimp. México, Continental. 785 p.
39. Holdgate, D. P.; Zandvoort, E. A. 1997. Strategic considerations for the establishment of microorganism free tissue cultures for commercial ornamental micropropagation. In: Cassells, A. C. ed. *Pathogen and microbial contamination management in micropropagation*. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer. cap. 2, pp. 15-22.

40. James, D. J.; Knight, V. H.; Thurbon, I. 1980. Micropropagation of red raspberry and the influence of phloroglucinol. *Scientia Horticulturae*. 12: 313-319.
41. Jordán, M.; Casaretto, J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento; auxinas, giberelinas y citocininas. In: Squeo, F. A.; Cardemil, L. eds. *Fisiología vegetal*. Serena, Universidad de La Serena. cap.16, pp.1-28.
42. Kane, M. E.; Kauth, P. H.; Stewart, S. 2008 Micropropagation. In: Beyl, C. A.; Trigiano, R. N. eds. *Plant propagation concepts and laboratory exercises*. Boca Raton, FL, CRC. cap. 12, pp. 319-332.
43. Krikorian, 1991. Estabilidad genotípica en células, tejidos y plantas derivadas de cultivos *in vitro*. In: Roca, W. M.; Mroginski, L. A. eds. *Cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia, CIAT. cap.3, pp.295-313.
44. Legrand, D. 1968. Las mirtáceas del Uruguay, III. Facultad de Agronomía (Montevideo). Boletín no. 101. 80 p.
45. Lloyd, G.; McCown, B. 1980. Commercially- feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use shoot-tip culture. *International Plant Propagation Society Proceedings*. 30: 421-427.
46. Lynch, P. T. 1999. Tissue culture techniques in *in vitro* plants conservation. In: Benson, E. E. ed. *Plant conservation biotechnology*. London, Taylor and Francis. cap.4, pp. 41-60.
47. Marks, T.; Simpson, E. 1990. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field- grown stock plants to darkness or low levels of irradiance. *Journal of Horticultural Science*. 65: 103-111.
48. Mattos, J. 1986. *A goiabeira serrana*. 2ª ed. Porto Alegre, RS, BR, IPRNR. 84 p. (Publicação IPRNR no. 19).
49. Mielke, M. S.; Fachinello, J. C. 1993. Propagação vegetativa da *goiabeira serrana* por enxertia de inverno. *Revista Brasileira de Fruticultura* (Cruz das Almas). 15(1): 91-95.
50. _____.; _____.; Nachtigal, J. C.; Matiuz, B.; Endres, L.; Dos Santos Filho, B. 1994. Comportamento fisiológico de *goiabeira serrana* quando multiplicada por mergulhia de cepa. *Scientia Agricola*. 51(1): 21-27.

51. Mitrofanova, I.V.; Mitrofanova, O.V. 2004. Development of recipient system of woody subtropical plants *in vitro*. Acta Universitatis Latviensis. Biology. 676: 189–196.
52. Montgomery, D. C. 2002. Diseño y análisis de experimentos. 2ª. ed. México, D. F., Limusa. 686 p.
53. Morton, J. 1987. *Feijoa*. In: Morton, J. ed. Fruits of warm climates. Miami, FL, Creative Resource System. pp. 367-370.
54. Mroginski, L. A.; Roca, W. M. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. In: Roca, W. M.; Mroginski, L. A. eds. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia, CIAT.cap.2, pp. 19-40.
55. Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 115: 473-497.
56. Olmos, S.; Luciani, G.; Galdeano, E. 2004. Micropropagación. In: Echenique, V.; Rubinstein, C.; Mroginsky, L. eds. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Buenos Aires, Argentina, INTA. cap.1, pp. 353-363.
57. 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.
58. Pachón, G.; Quintero, O. 1992. La feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg) fruta promisoría para Colombia. Acta Horticulturae.no. 310: 239-247.
59. Pagnussat, G. C.; Simontacchi, M.; Puntarulo, S.; Lamattina, L. 2002. Nitric oxide is required for root organogenesis. Plant Physiology. 129(3): 954-956.
60. Parra, A.; Fischer, G. 2013. Maduración y comportamiento poscosecha de la feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret); una revisión. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas. 7(1): 98-110.
61. Passey, A. J.; Jones, O. P. 1983. Shoot proliferation and rooting *in vitro* of *Theobroma cacao* L. type Amelonado. Journal of Horticultural Science. 58:589–592.

62. Perea Dallos, M.; Fischer, G.; Lasprilla, D. M. 2010. Feijoa. *Acca sellowiana* Berg. In: Perea Dallos, M.; Matallana Ramírez, L. P.; Tirado Perea, P. eds. Biotecnología aplicada al mejoramiento de los cultivos de frutas tropicales. Bogotá, UNIBIBLOS. pp. 300-349.
63. Pierik, R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Madrid, España, Mundi-Prensa. 326 p.
64. Quezada, M. 2011. Construcción del primer mapa de ligamiento de la especie *Acca sellowiana* (Berg.) Burret empleando marcadores moleculares. Tesis Magister en Ciencias Agrarias opción Ciencias Vegetales. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 57 p.
65. Rivas, M.; Vignale, B.; Camussi, G.; Pritsch, C.; Puppo, M. 2007. Los recursos genéticos de *Acca sellowiana*(Berg.) Burret en Uruguay. In: Avances de Investigación en Recursos Genéticos del Cono Sur II. Montevideo. v.2, pp.103-112.
66. Roca, W. M.; Mroginski, L. A. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia, CIAT. 969 p.
67. Ross, S.; Grasso, R. 2010. *In vitro* propagation of “Guayabo del país ”(*Acca sellowiana* (Berg.) Burret). Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology. 4 (1): 83-87.
68. Salvarrey, M. J. 2008. Evaluación de diferentes técnicas de propagación vegetativa en "Guayabo del país " (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret.). Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 79 p.
69. Sampaio, V. R.; Barbin, D. 1983. Propagação da pereira através de estacas folhosas em ambiente de nebulização. Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 40(1): 509-517.
70. Sarkar, D.; Naik, P. S. 2000. Phloroglucinol enhances growth and rate of axillary shoot proliferation in potato shoot tip cultures *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 60(2): 139-149.
71. Taiz, L.; Zeiger, E. 2002. Plant physiology. 5th. ed. Sunderland, Sinauer Associates. pp. 423-460.

72. Tállice, R.; Castro, J. L.; Izaguirre, P. 1996. Prospección y evaluación de frutas autóctonas con énfasis en la guayaba del país y durazno. Informe final. Montevideo, INIA. s.p. (FPTA no. 054).
73. Teixeira Da Silva, J. A.; Dobránszki, J.; Ross, S. 2013. Phloroglucinol in plant tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 49(1): 1-16.
74. Thorp, G.; Bieleski, R. 2002. Feijoas; origins, cultivation and uses. Auckland, New Zealand, D. Bateman. 87 p.
75. Vidal Talamini do Amarante, C.; Dos Santos, K. L. 2011. Goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*). (en línea). *Revista Brasileira de Fruticultura*. 33(1): s.p. Consultado 6 jul. 2014. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452011000100042
76. Vignale, B.; Bisio, L. 2004. Selección de frutas nativas con potencial comercial en Uruguay. *In: Simposio Nacional do Morango (2°), Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas (1o., 2004, Palestras). Trabalhos apresentados. Pelotas, RS, BR, EMBRAPA Clima Temperado pp. 243-251 (Documentos no. 124).*
77. _____.; _____. 2005. Selección de frutales nativos en Uruguay. *Agrociencia (Montevideo)*. 9 (1-2): 35-39.
78. _____.; Camussi, G.; Cabrera, D.; Nebel, J. P.; Cunda, N.; Pritsch, C. 2006. Avances en la selección del Guayabo del país *Acca sellowiana* (Berg) Burret en Uruguay. *In: Simposio Nacional do Morango (3°); Encontro de Pequenas Frutas Nativas do MERCOSUR (2o., 2007, Pelotas). Trabalhos apresentados. Pelotas, BR, EMBRAPA Clima Temperado. pp.155-160 (Documentos no. 203).*
79. Vuotto, M. L.; Basile, A.; Moscatiello, V.; De Sole, P.; Castaldo- Cobianchi, R.; Laghi, E.; Ielpo, M. T. L. 2000. Antimicrobial and antioxidant activities of *Feijoa sellowiana* fruit. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 13: 197-201.
80. Weston, R.J. 2010. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae); a review. *Food Chemistry*. 121: 923 – 926.