

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION

ESCUELA DE POSTGRADO

LIBRO 100
SAPOTACEAS
1998

**DESARROLLO DE METODOS DE PROPAGACION PARA LA
CONSERVACION Y PROPAGACION *EX SITU* DE ESPECIES DE SAPOTACEAS:
POUTERIA SAPOTA (JACQ.)**

POR

SUSANA DOLORES LOBATO ARTIGA



**CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA
CONSERVACIÓN
ESCUELA DE POSTGRADO**



**“DESARROLLO DE MÉTODOS DE PROPAGACIÓN PARA LA
CONSERVACIÓN Y PROPAGACIÓN DE *POUTERIA SAPOTA* (JACQ.)”.**

POR:

SUSANA DOLORES LOBATO ARTIGA

Turrialba, Costa Rica.

1998

**CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA
ÁREA DE POSTGRADO**

**“DESARROLLO DE MÉTODOS DE PROPAGACIÓN PARA LA
CONSERVACIÓN Y PROPAGACIÓN DE *POUTERIA SAPOTA*
(JACQ.)”.**

**Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico Académico del Programa de Estudios de
Postgrado en Ciencias Agrícola y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de
Investigación y Enseñanza, para optar al grado de**

MAGISTER SCIENTIAE

por

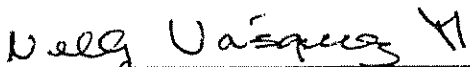
SUSANA DOLORES LOBATO ARTIGA

**CATIE
Turrialba, Costa Rica
1998**

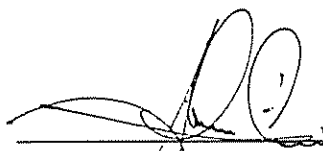
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Dirección de la Escuela de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

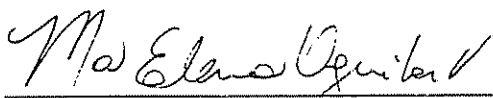
FIRMANTES:



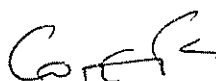
Nelly Vásquez
Profesor Consejero




Francisco Mesén
Miembro Comité Asesor



María Elena Aguilar
Miembro Comité Asesor



Francois Cote
Miembro Comité Asesor



Juan A. Aguirre
Director y Decano de la Escuela de Postgrado



Susana Lobato Artiga
Candidato

DEDICATORIA

A Dios por haber estado conmigo en todo el camino.

A mis padres Jesús y José por apoyarme siempre y por todo el amor mostrado.

A mis hermanos y hermana que estuvieron conmigo.

A mi tío Ricardo con mucho amor, cariño y recuerdo.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis sinceros agradecimientos a:

MSc. Nelly Vásquez, que más que una directora de tesis fue una amiga a lo largo de la realización de esta tesis, facilitándome y dándome toda la ayuda que yo necesitaba.

Todos los miembros del Comité Asesor por su apoyo en las diferentes áreas técnicas de la investigación y sugerencias en el desarrollo del mismo.

A Ing. Alma Saravia, por toda su ayuda y colaboración para realizar mis estudios de postgrado.

A todo el personal de la Unidad de Biotecnología por su desinteresada colaboración en el desarrollo de la investigación y muy especialmente por el compañerismo mostrado.

Al gobierno de Holanda por el financiamiento de mis estudios.

A la Escuela de Postgrado del CATIE, por brindarme la oportunidad de continuar mis estudios.

Un agradecimiento especial para Karol por toda su colaboración, sin la cual en momentos difíciles no habría podido con todo el trabajo.

Mis mas sinceras muestras de aprecio y cariño para Carlos Umaña, técnico de CATIE, por toda su ayuda y comprensión a lo largo de toda la investigación.

A la escuela de Postgrado, por brindarme la oportunidad de continuar mis estudios.

A mi Grupo sin el no hubiera podido llevar una estancia tan amena en CATIE, se quedaran en mis recuerdos para siempre.

A Willis que más te puedo decir, nada, o un no sé.

A mis compañeros y compañeras de maestría, espero que Dios los bendiga en su vida profesional.

CONTENIDO

	Página
Resumen	ix
Summary	x
Lista de figuras	xi
Lista de Cuadros	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	4
1.1.1. General	4
1.1.2. Específico	4
1.2. Hipótesis	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1. Generalidades del cultivo	6
2.1.1. Taxonomía de la especie <i>Pouteria sapota</i>	6
2.1.2. Origen y distribución	7
2.1.3. Descripción botánica de <i>Pouteria sapota</i> .	9
2.1.4. Floración y fructificación	10
2.1.5. Cultivares	11
2.1.6. Composición del fruto	11
2.1.7. Clima y suelos	12
2.2. Prácticas de Propagación	13
2.2.1. Propagación sexual	13
2.2.2. Propagación asexual	15
2.2.2.1. Propagación por estacas	16
2.2.2.2. Propagación por injertos	21
2.2.2.2.1. Ventajas de la injertación	21

2.2.2.2.2. Conocimientos previos para el éxito en la injertación	22
2.2.2.2.3. Factores importantes a considerar en la injertación del zapote	23
2.2.2.2.4. Tipos de injertos	27
2.2.2.2.4.1. Injerto de enchape lateral	27
2.2.2.2.4.2. Injerto de púa	28
2.2.2.3. Cultivo de Tejidos	29
2.2.2.3.1 Propagación <i>in vitro</i> de árboles frutales.	30
2.2.2.3.2. Cultivo de Ápices en cultivo <i>in vitro</i>	33
2.2.2.3.3. Microinjerto <i>in vitro</i> de especies frutales	34
3. MATERIALES Y METODOS	37
3.1. Macropropagación de <i>Pouteria sapota</i> (injertación y enraizamiento de estacas)	37
3.1.1 Localización del estudio	37
3.1.2 Condiciones físicas de cultivo	37
3.1.3 Material vegetal	37
3.1.3.1 Material vegetal para las pruebas de Injertación	37
3.1.3.1.1 Obtención de patrón	37
3.1.3.1.2 Obtención de varetas	38
3.1.3.1 Material vegetal utilizado en el enraizamiento de estacas	38
3.1.4 Experimentos realizados	39
3.1.4.1 Injertación del material de sapote	39
3.1.4.1.1 Injerto de púa	39
3.1.4.1.2 Injerto de enchape lateral	40
3.1.4.2 Propagación por estacas	42
3.2 Micropropagación de <i>Pouteria sapota</i> (cultivo de ápices y microinjertos)	47
3.2.1 Localización del estudio	47

3.2.2	Condiciones físicas del cultivo	47
3.2.3.	Material vegetal utilizado en el Cultivo <i>in vitro</i> .	47
3.2.4.	Cultivo de ápices	47
3.2.4.1	Desinfección de los explantes	49
3.2.5	Microinjertos	49
3.2.5.1	Preparación del portainjerto	49
3.2.5.2	Preparación del ápice-injerto.	50
3.2.5.3	Procedimiento para el microinjerto	50
3.3	Estudio histológico	51
3.4	Modelo estadístico	51
3.4.1	Variables analizadas para la macropropagación	52
3.4.1.1	Injertación	52
3.4.1.2	Enraizamiento de estacas	52
3.4.2	Variables analizadas para la micropropagación	53
3.4.2.1	Cultivo de ápices	53
3.4.2.2	Microinjertos	53
4.	RESULTADOS	54
4.1	Macropropagación de la especie	54
4.1.1	Ensayo de injertación	54
4.1.1.1	Desarrollo del injerto (longitud)	55
4.1.1.2	Sobrevivencia de los injertos	56
4.1.1.3	Porcentaje de prendimiento	60
4.1.2	Enraizamiento de estacas	61
4.1.2.1	Primer ensayo de enraizamiento con brotes rejuvenecidos	62
4.1.2.1.1	Turgencia	63
4.1.2.1.2	Desarrollo de callo	64
4.1.2.1.2.1	Estudios histológicos	67
4.1.2.1.3	Presencia de hoja	72

4.1.2.1.4	Desarrollo de brotes	73
4.1.2.1.5	Enraizamiento	75
4.1.2.2	Segundo ensayo de enraizamiento	76
4.1.2.2.1	Turgencia	76
4.1.2.2.2	Desarrollo de callos	78
4.1.2.2.3	Presencia de hojas	79
4.1.2.2.4	Desarrollo de brotes	80
4.1.2.2.5	Enraizamiento	80
4.2	Micropropagación de <i>Pouteria sapota</i>	82
4.2.1	Cultivo de ápices	82
4.2.2	Microinjertos	89
5.	DISCUSIÓN	91
5.1	Macropropagación de la especie	91
5.1.1	Ensayo de injertación	91
5.1.2	Ensayo de enraizamiento de estacas	93
5.2	Micropropagación de la especie	98
5.2.1	Cultivo de ápices <i>in vitro</i>	98
5.2.2	Microinjertos de <i>Pouteria sapota</i>	102
6.	CONCLUSIONES	104
7.	RECOMENDACIONES	106
8.	BIBLIOGRAFÍA	108
9.	ANEXOS	116

LOBATO, S. D. 1998. Desarrollo de métodos de propagación para la conservación de *Pouteria sapota* (Jacq.). Thesis Mag. Scientiae. 1998. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba. Costa Rica, 131 p.

Palabras claves: Propagación vegetativa, conservación, multiplicación, injertación, enraizamiento de estacas, cultivo de ápices, microinjertación, *Pouteria sapota*.

El cultivo del zapote pese a una creciente demanda del fruto en el mercado y a la amplia gama de subproductos que se obtienen como resultado de su explotación, así como los beneficios que brinda para el desarrollo y conservación de los agroecosistemas donde se encuentra establecido, afronta otros dos problemas fundamentales que limitan su desarrollo en explotaciones comerciales: por un lado la falta de métodos eficaces y eficientes de propagación que permitan la obtención de gran cantidad de plantas con características homogéneas y por otro la conservación y desarrollo de clones a partir de individuos silvestres promisorios para el desarrollo de programas de mejoramiento genético. Es así como el objetivo de la presente investigación es establecer técnicas de propagación que sirvan de base para la búsqueda de métodos eficientes para la conservación y multiplicación de materiales de *Pouteria*.

La investigación fue llevada a cabo utilizando diferentes técnicas de propagación vegetativa:

a) Macropropagación: se realizó en el Campo Experimental Cabiria y se utilizó las técnicas de injertación y enraizamiento de estacas de diferentes genotipos de la colección de sapotáceas del CATIE. b) Micropropagación: se llevó a cabo en los laboratorios de Biotecnología del CATIE, se utilizó las técnicas de cultivo *in vitro* de ápices y microinjertación.

El análisis estadístico se realizó por medio de análisis de varianza y de diferencias mínimas significativas aplicado a un diseño de parcelas divididas en el tiempo y en el caso de la variable porcentaje de prendimiento a un diseño factorial sin repeticiones, en el cual se tomó la triple interacción para estimar el error experimental.

Se encontró que la injertación fue favorecida por condiciones controladas de invernadero, así mismo la técnica de enchape lateral proporcionó los mayores los porcentajes de prendimiento.

A su vez, la técnica de enraizamiento de estacas, a pesar de que no brindó los resultados esperados, permitió la identificación de un genotipo con potencial para explotarse, ya que fue el único que formó una raíz adventicia y mantuvo un buen porcentaje de viabilidad y turgencia a lo largo de los ensayos. Los mejores resultados fueron obtenidos utilizando el sustrato arena. De acuerdo a los estudios histológicos, estas dos técnicas se ven muy influenciadas por aspectos físicos propios de las especies que limitan su respuesta; entre ellos se encuentran una banda de fibras anterior al cambium y gran presencia de canales gomíferos en su corteza.

Con la utilización de la técnica de cultivo *in vitro* se confirmó la dificultad de multiplicar especies leñosas, no obstante se dejan las bases en materia de desinfección y eliminación de oxidación, que puede ser de interés en futuros experimentos. En lo que respecta a microinjertación los pocos resultados obtenidos no permitieron obtener muchos aspectos relacionados con la utilización de esta técnica para la multiplicación y conservación de genotipos de la especie, aunque a partir de los resultados preliminares se observó la posibilidad de la utilización de la metodología de enchape lateral para posteriores investigaciones.

Se recomienda seguir efectuando pruebas de factores limitantes tanto exógeno como endógenos que limitan las técnicas de propagación por medio de injertos y de enraizamiento de estacas para esta especie, y continuar con el desarrollo de un protocolo de multiplicación y conservación *in vitro* de sapotáceas.

Lobato, S.D. 1998. Development of propagation methods for the conservation of *Pouteria sapota* (Jacq.) Thesis Mag. Scientiae. 1998. Tropical Agricultural Research and Higher Education Center. Turrialba, Costa Rica , 131 p.

Key words: Vegetative propagation, conservation, multiplication. grafts, rooting, culture of apex, micrografts, *Pouteria sapota*.

The "sapote" plum cultivation, in spite of the demand of the fruit in the market and to the ample by-product range that is obtained as a result of its exploitation, as well as the benefits that it offers for the development and conservation of agrosystems where it is find established, it confronts other two fundamental problems that limit its development in commercial exploitations; in one side the lack of effective and efficient methods of propagation that allows it to obtain a great quantity of plants with homogeneous characteristics and on the other hand the conservation and development of clones from promissory wild individuals for the development of programs of genetic improvement. This is why the objective of the present investigation is to establish techniques of propagation that may serve as bases for the search of efficient methods for the conservation and multiplication of *Pouteria* materials.

The investigation was carried out using different techniques from vegetative propagation: a) Macropropagation: it took place at the Cabiria Experimental Field and grafting techniques and rooting of different genotypes from CATIE's collection of sapotaceas. B) Micropropagation: it was carried out in CATIE's Biotechnology Laboratory, the *in vitro* cultivation techniques of apexes and micrografts were used.

The statistical analysis was carried out by means of analysis of variance and different significant minimums applied from a design of divided parcels in time and the case of the percentage variable of capture to a factorial design without repetitions, in which the triple interaction was considered to estimate the experimental error.

It was found that grafting was favored by controlled greenhouse conditions, also the technique of lateral plates provided the major percentage of capture.

At the same time, the technique of rooting, although it did not offer the desired results, it allowed the identification of a genotype with exploitation potential, since it was the only one that formed an adventitious root and maintained a good percentage of viability and turgescence throughout the experiments. The best results were obtained by using the substrate sand. According to the histological studies, these two techniques are very influenced by the species own physical aspects that limit their answer; among them are fiber bands previous to the cambium and great presence of resinous channels in their bark.

With the use of the *in vitro* cultivation techniques the difficulty to multiply woody species was confirmed; nevertheless, the bases are left in disinfecting material and elimination of oxidation, that can be of interest for future experiments. Regarding micrografts the few results obtained did not allow to obtain many aspects related to the use of this technique for the multiplication and conservation of genotypes of the species, although it was observed from the preliminary results of the possibility of using the methodology of lateral plates for later investigations.

It is recommended to continue with tests of limiting factors such as exogenous as well as endogenous that limit the techniques of propagation by means of grafts and stake rooting for this species, and to continue with the development of a protocol of multiplication and conservation *in vitro* of sapotaceas.

Lista de Figuras

Figura	página
Fig. 1 a. Injertos en condiciones de campo. CATIE, 1990.....	41
Fig. 1 b. Injertos en condiciones de invernadero. CATIE, 1998.....	41
Fig. 2 Estacas adultas de <i>Pouteria sapota</i> , utilizadas para la técnica de enraizamiento. CATIE, 1998.....	42
Fig. 3 Brotes rejuvenecidos de <i>Pouteria sapota</i> . CATIE, 1998.....	43
Fig. 4 Estacas rejuvenecida de <i>Pouteria sapota</i> . CATIE, 1998.....	44
Fig. 5 Estacas colocadas en el propagador de subirrigación en los dos medios de Enraizamiento, arena y aserrín. CATIE, 1998.....	46
Fig. 6 a. Plantas madres de <i>Pouteria sapota</i> en el invernadero, fuente de explantes para el cultivo <i>in vitro</i> de ápices. CATIE, 1998.....	48
Fig. 6 a. Plantulas de <i>Pouteria sapota</i> de donde se tomaron los ápices. CATIE, 1998.....	48
Fig. 7 Longitud promedio de los injertos para los genotipos evaluados en condiciones de campo a través del tiempo.....	56
Fig. 8 Longitud promedio de los injertos para los genotipos evaluados en condiciones de invernadero a través del tiempo.....	56
Fig. 9 a Desarrollo de primordios foliares en injertos de <i>Pouteria sapota</i> , utilizando la técnica de injerto de corona. CATIE, 1998.....	57
Fig. 9 b Alargamiento y desarrollo foliar del injerto de <i>Pouteria sapota</i> , utilizando la técnica de injerto de corona. CATIE, 1998.....	57
Fig. 10 Sobrevivencia de injertos de zapote para los genotipos evaluados utilizando la técnica de injerto de corona a través del tiempo.....	58
Fig. 11 Sobrevivencia de injertos de zapote para los genotipos evaluados utilizando la técnica de injerto de enchape lateral a través del tiempo.....	59
Fig. 12 Sobrevivencia de injertos de zapote para las condiciones de invernadero y de campo, utilizando la técnica de injerto de corona a través del tiempo.....	59

Fig. 13 Sobrevivencia de injertos de zapote para la condiciones de invernadero y de campo, utilizando la técnica de injerto enchape lateral a través del tiempo.....	60
Fig. 14 Porcentaje de prendimiento para los injertos de zapote utilizando las técnicas de corona(1) y enchape lateral (2).....	61
Fig. 15 Formación de estructuras globulares (callos)de estacas adultas de <i>Pouteria Sapota</i> . CATIE, 1998.....	61
Fig. 16 Turgencia de los genotipos evaluados para el sustrato arena a través del tiempo.....	63
Fig. 17 Turgencia de los genotipos evaluados para el sustrato aserrín a través del tiempo.....	64
Fig. 18 Formación de estructuras globulares (callos) de estacas rejuvenecidas de <i>Pouteria sapota</i> . CATIE, 1998.....	65
Fig.19 Desarrollo de callos para los genotipos evaluados en los sustratos aserrín y arena	66
Fig. 20 Desarrollo de callos para los genotipos evaluados a través del tiempo.....	66
Fig. 21 Desarrollo de callos para los sustratos arena y aserrín a través del tiempo.....	67
Fig. 22 Corte transversal de tallo donde se observa la banda de fibra protofloicas (B.F). CATIE, 1998.....	69
Fig. 23 Sección transversal de tallos mostrando cambium vascular de <i>Pouteria sapota</i> . CATIE, 1998 (C.V:cambium vascular). CATIE, 1998.....	69
Fig. 24 Sección transversal de tallo donde se observa el área del xilema (E.V: elemento de los vasos; R: Rayo; F:Fibras). CATIE, 1998	70
Fig. 25 Sección transversal de tallo que muestra el parénquima cortical. Obsérvese la gran cantidad de canales secretores (C.S) en el genotipo 11252-1(a) en comparación de las del genotipo 10800-2(b). CATIE, 1998.	70
Fig. 26 Sección transversal de estaca después de 16 semana de iniciada la siembra mostrando taponeamiento de los vasos (T.P) y deterioro general de los tejidos. CATIE, 1998.....	71
Fig. 27 Sección transversal de estacas donde se muestra la formación de callo en la base de la misma. CATIE, 1998.....	71

Fig. 28 Presencia de hojas para los genotipos evaluados en los sustratos aserrín y arena.....	72
Fig. 29 Presencia de hojas para los genotipos evaluados a través del tiempo.	73
Fig. 30 Presencia de hojas para los sustratos aserrín y arena a través del tiempo	73
Fig. 31 Desarrollo de brotes para los genotipos evaluados en el sustrato arena a través del tiempo.....	74
Fig. 32 Desarrollo de brotes para los genotipos evaluados en el sustrato aserrín a través del tiempo.	74
Fig. 33 Enraizamiento de estacas rejuvenecidas de <i>P.sapota</i> (16 semanas; 0,3% AIB). CATIE, 1998.....	75
Fig. 34 Turgencia de los genotipos evaluados para el sustrato arena a través del tiempo.....	77
Fig. 35 Turgencia de los genotipos evaluados para el sustrato aserrín a través del tiempo.....	77
Fig. 36 Desarrollo de callos para los genotipos 10641-1 y 10800-2 en el sustrato arena a través del tiempo.....	78
Fig. 37 Desarrollo de callos para los genotipos 10641-1 y 10800-2 en el sustrato aserrín a través del tiempo.....	79
Fig. 38 Presencia de hojas para los genotipos evaluados en los sustratos arena y aserrín	80
Fig.39 Presencia de hojas para los sustratos arena y aserrín a través del tiempo.....	80
Fig. 40 Enraizamiento de estaca rejuvenecida de <i>P. sapota</i> (8ª semana, 1,2% AIB). CATIE, 1998.....	81
Fig. 41 Presencia de ápices contaminados con bacteria 16 días después de iniciada la siembra.....	81
Fig. 42 Ápice de <i>Pouteria sapota</i> cultivado <i>in vitro</i> (2ª semana después de iniciada la siembra. CATIE, 1998.....	84
Fig. 43 Divisiones periclinales en el parénquima del portainjerto y del ápice para formar el punto de unión entre ambos. CATIE, 1998.....	90

Fig. 44 Sección longitudinal donde se muestra el punto de unión entre el portainjerto y el ápice injerto. CATIE, 1998.....	90
--	----

En anexos:

Anexo 2: Injerto de enchape lateral a) Vareta antes de ser cortada; b) preparación de la vareta; c) vareta en injerto; d) envoltura con cinta; e) injerto completo y amarrado.....	117
Anexo 3 Injerto de púa. A) Vareta (púa) antes de ser injertada; B) Patrón sobre el cual se injertará; C) Acoplamiento del patrón y del injerto.....	118
Anexo 5: Propagador de subirrigación.....	119

Lista de Cuadros

En el texto	Página
Cuadro 1. Composición química física por 100 g de porción comestible de <i>Pouteria sapota</i> . CATIE, 1998.....	12
Cuadro 2. Análisis de varianza para las variables longitud, prendimiento y Sobrevivencia para los injertos de <i>Pouteria sapota</i> , CATIE, 1998... ..	54
Cuadro 3. Análisis de varianza para la variable porcentaje de prendimiento para los Injertos de <i>Pouteria sapota</i> . CATIE, 1998.....	54
Cuadro 4. Análisis de varianza para las variables turgencia, callo, presencia de hojas y brotes para <i>Pouteria sapota</i> . CATIE, 1998.....	62
Cuadro 5. Análisis de varianza para las variables turgencia, presencia de callo, presencia de hojas para <i>Pouteria sapota</i> . CATIE, 1998.....	76
Cuadro 6. Porcentaje de ápices sanos, contaminados con hongos, bacterias y oxidados 16 días después de iniciada la siembra.....	83
Cuadro 7. Porcentajes de ápices sanos, contaminados por hongos y oxidados 12 días después de iniciada la siembra. CATIE, 1998.....	85
Cuadro 8. Porcentajes de ápices sanos, contaminados con hongos, bacterias y oxidados 16 días después de iniciada la siembra. CATIE, 1998.....	86
Cuadro 9. Porcentajes de ápices sanos, contaminados con hongos, bacterias y oxidados 16 días después de iniciada la siembra. CATIE, 1998.....	88
Cuadro 9. Porcentajes de ápices sanos, contaminados con hongos, bacteria y oxidados 16 días después de iniciada la siembra. CATIE, 1998.....	89
En apéndice	
Anexo 1: Características de mamey sapote y disponibilidad de cada cultivar para la producción comercial.....	116
Anexo 4 Programa de aplicaciones química al suelo y foliar.....	118
Anexo 6: Condiciones ambientales promedio dentro de los propagadores, Turrialba, Costa Rica, marzo 1997.....	120
Anexo 7. Composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS).....	120

Anexo 8 Protocolo de deshidratación, infiltración y tinción empleado para el estudio histológico de estacas y de microinjertos.....	121
Anexo 9 Análisis estadístico utilizado en la propagación vegetativa de sapote <i>Pouteria sapota</i>	122
Anexo 10 Diferencia mínima significativa para la variable longitud para la semana once. CATIE, 1998.....	123
Anexo 11 Diferencia mínima significativa para la variable sobrevivencia para la semana once. CATIE, 1998.....	123
Anexo 12 Diferencia mínima significativa para la variable sobrevivencia para la semana once. CATIE, 1998.....	124
Anexo 13 Diferencia mínima significativa para las variables porcentaje de prendimiento. CATIE, 1998.....	124
Anexo 14 Diferencia mínima significativa para las variables turgencia y desarrollo de brote. CATIE, 1998.....	124
Anexo 15 Diferencia mínima significativa para las variables desarrollo de callos y presencia de hojas. CATIE, 1998.....	125
Anexo 16 Diferencia mínima significativa para las variables desarrollo de callos y presencia de hojas para la semana dieciséis. CATIE, 1998.....	125
Anexo 17 Diferencia mínima significativa para las variables desarrollo de callos y presencia de hojas para las últimas tres semanas de evaluación, ensayo de enraizamiento 2. CATIE, 1998.....	126
Anexo 18 Diferencia mínima significativa para las variable presencia de hojas para las últimas tres semanas de evaluación, ensayo de enraizamiento 2. CATIE, 1998.....	126
Anexo 19 Diferencia mínima significativa para las variables turgencia y desarrollo de callos, ensayo de enraizamiento 2. CATIE, 1998.....	126
Anexo 20 Diferencia mínima significativa para las variable presencia de hojas, ensayo de enraizamiento 2. CATIE, 1998.....	127
Anexo 21 Análisis de varianza para las variables sanos, conhong, conbact y oxid para ápices de <i>Pouteria viridis</i> . CATIE, 1998.....	127

Anexo 22 Diferencia mínima significativa para las variables presencia de ápices sanos y contaminados con hongos. CATIE, 1998.....	127
Anexo 23 Análisis de varianza para las variables sanos, conhong, conbact y oxid para ápices de <i>Pouteria viridis</i> . CATIE, 1998.....	128
Anexo 24 Diferencia mínima significativa para las variables presencia de ápices sanos contaminados con hongos y con oxidación. CATIE, 1998.....	128
Anexo 25 Prueba de Tukey para la variable contaminación con bacteria. CATIE, 1998.....	128
Anexo 26 Análisis de varianza para las variables sanos, conhong, conbact y oxid para ápices de <i>Pouteria sapota</i> . CATIE, 1998.....	128
Anexo 27 Diferencia mínima significativa para las variables presencia de ápices contaminados con bacterias, hongos y con oxidación. CATIE, 1998.....	129
Anexo 28 Análisis de varianza para las variables sanos, conhong, conbact y oxid para ápices de <i>Pouteria sapota</i> . CATIE, 1998.....	129
Anexo 29 Diferencia mínima significativa para las variables presencia de ápices sanos, contaminados con hongos y con oxidación. CATIE, 1998.....	129
Anexo 30 Análisis de varianza para las variables sanos, conhong, conbact y oxid para ápices de <i>Pouteria sapota</i> . CATIE, 1998.....	129
Anexo 31 Diferencia mínima significativa para las variables presencia de ápices sanos, contaminados con hongos y con oxidación. CATIE, 1998.....	130

1. INTRODUCCION

Centro América está pasando por una difícil situación económica que se refleja en el campo agroindustrial, que hace necesaria una reactivación económica que pueda traducirse en inversiones de productos no tradicionales. Entre los frutales de la América Tropical, de interés, se destacan los de la familia de las sapotáceas (FAO, 1992).

Las sapotáceas constituyen una familia de árboles y arbustos pantropicales de tamaño medio que contiene cerca de 450 especies en los neotrópicos, distribuidos desde la parte sur de los Estados Unidos, México, Centro América y las Antillas, hasta Paraguay, Uruguay y Chile. Entre las especies más conocidas dentro de esta familia se mencionan: *Pouteria sapota* (zapote), *Pouteria viridis* (injerto), *Pouteria campechiana* (canistel) y *Chrysophyllum cainito* (caimito) (Pennington, 1990). Entre éstas, el zapote puede citarse como ejemplo de especie no tradicional que ofrece un potencial económico para la diversificación agrícola de la región y por ende para conseguir un mayor equilibrio ecológico (FAO, 1992). En el estado de Florida, Cuba y Centro América ha llegado a establecerse una pequeña, pero viable industria (Balerdi *et al.* 1996).

A pesar del hecho que América Central posee características climáticas, edáficas, topográficas, y sociales que podrían permitir un desarrollo y aprovechamiento más integral de este recurso genético, esta fruta no es bien conocida, probablemente porque sus semillas no soportaron el transporte intercontinental durante la colonia debido a su corta vida. Recientemente, se ha presentado un creciente interés por esta fruta en otros lugares (Australia, Israel, Filipinas, Vietnam, España y Venezuela) (Balerdi *et al.* 1996), pero sólo existen algunas plantaciones comerciales pequeñas y árboles aislados en que pueden permitir su promoción tanto a nivel local como para la exportación. En estas regiones hay pocas colecciones de germoplasma, y se cuenta con escaso personal capacitado para llevar a cabo la transferencia tecnológica del cultivo. A pesar del beneficio potencial que podría tener para los agricultores y para la industria, existe aún poca investigación e información sobre su explotación y uso. Un mejor conocimiento de la diversidad genética, variaciones estacionales

de la producción, calidad, oferta y demanda de esta especie permitirían incentivar el monocultivo o el cultivo asociado a otros cultivos perennes (FAO, 1992).

El establecimiento del zapote puede ser un proceso lento, dado que requiere investigación, tiempo e inversión. La experiencia con otros cultivos indica que, sin una adecuada estrategia de comercialización y un desarrollo sostenido, el agricultor puede resultar perjudicado. En efecto, éste suele desconocer las normas de calidad que rigen la producción, ignorar los métodos de un manejo eficaz y debe hacer frente a elevados costos de cosecha. Se ha de hacer incapié en que la investigación, la producción comercial y la comercialización son los factores claves para establecer con éxito los cultivos no tradicionales (FAO, 1992).

El fruto de *Pouteria* es usualmente comido en preparaciones donde la pulpa fresca o congelada es mezclada con otros ingredientes para hacer licuados o helados. Puede también ser consumida directamente la pulpa fresca de la fruta, removiendo la semilla. Es además utilizable en jaleas, pastas y conservas. (Balerdi *et al.* 1996). Las semillas en México y Centro América, se utilizan molidas para dar al chocolate el sabor amargo y el aroma característico. De la semilla se pueden extraer aceites, los cuales tienen múltiples usos medicinales. En Puerto Rico se ha comprobado que el polvo hecho con la semilla o el látex del fruto verde pueden ser insecticidas eficaces. El aceite contenido en la semilla usualmente es utilizado en El Salvador y Guatemala como un tónico para la piel, como revitalizador del pelo evitando su caída y empleado para dolores musculares y afecciones reumáticas (Morera, 1992).

Los árboles del género *Pouteria*, además de sus frutos, producen un látex que se encuentra en la corteza, y se obtiene haciendo heridas en el tronco. Este látex se conoce con el nombre de chicle, ingrediente principal de la goma de mascar (Morera, 1992).

La corteza y las hojas en forma de cocción se usan contra la arteriosclerosis y puede servir para bajar la presión arterial. Las hojas con frecuencia se usan para envolver las plantas de tomate a la hora del trasplante, evitando daños de gusanos cortadores y de otras plagas del suelo (Morera, 1992).

La madera es rojiza y sólida y es usada en la construcción de muebles y en trabajos que requieran maderas muy fuertes (Morera, 1997)

Desde el punto de vista ecológico, es de enorme importancia impulsar el cultivo de esta especie ya que permite ayudar a mantener la diversidad genética y evitar que algunos genotipos con valor potencial puedan desaparecer.

Su establecimiento como cultivo en sistemas de producción tradicional permitirá mantener un desarrollo frutícola de gran sostenibilidad. El desarrollo agroindustrial se verá beneficiado con la producción de frutas de gran valor nutritivo y subproductos de alto valor agregado (FAO, 1992). En el estado de Florida, Cuba y Centro América ha llegado a establecerse una pequeña, pero viable industria (Balerdi *et al.* 1996). En Florida ha sido introducida y sembrada probablemente desde hace 100 años y recientemente incrementada por la cultura cubana; llegando esta fruta a adquirir un valor fabuloso de \$10 o más por libra de pulpa deshidratada (Morera, 1992); una planta injertada de zapote cuesta hasta \$45.00 y una pequeña caja de semillas de mamey zapote se adquiere a un valor de \$12.00. Debido a que un árbol es capaz de producir en su máximo pico de producción entre 200 y 400 frutos, se puede indicar que este cultivo promete alta rentabilidad para la agricultura del trópico americano (Morera, 1992).

Tomando en cuenta la importancia comercial, ecológica y social del zapote, así como su escasa tecnología de manejo, se hacen necesarios estudios básicos con el fin de establecer una metodología eficiente de propagación y de esta forma conservarlo como un recurso fitogenético nativo de América Tropical; de tal manera que estos estudios definan el punto de partida para posteriores evaluaciones agronómicas, mejoramiento genético, selección y reproducción de aquellos materiales que reúnan características deseables para un programa de fomento y diversificación de la producción agrícola (Martínez y Utrera , 1994).

Es por ello, que con el fin de buscar metodologías eficientes de multiplicación y conservación de materiales seleccionados, se llevó a cabo la presente investigación.

1.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.1.1 General

Establecer técnicas de propagación *ex vitro* e *in vitro* que sirvan de base para la búsqueda de métodos eficientes para la conservación de materiales de *Pouteria*.

1.1.2. Específicos

1. Comprobar el efecto de la aplicación de diferentes técnicas de injertado, ambientes y genotipos sobre el porcentaje de prendimiento de los injertos de la especie .
2. Determinar los efectos de diferentes sustratos, dosis de auxina y genotipos utilizados sobre el porcentaje de enraizamiento.
3. Obtener un método de desinfección del material vegetal procedente de invernadero para el establecimiento de cultivo *in vitro*.

1.2 HIPOTESIS

1. Los porcentajes de enraizamiento no aumentan conforme se incrementa la concentración del ácido indole butírico (AIB).
2. No existen diferencias entre los sustratos utilizados en cuanto a los porcentajes de enraizamiento.

3. No existen diferencias de porcentajes de prendimiento de los injertos en cuanto a las técnicas de injerto utilizados, ni bajo las diferentes condiciones de ambientes o con los genotipos utilizados.

4. Los porcentajes de contaminación u oxidación de los ápices provenientes de material de invernadero no interferirán con el desarrollo de la técnica.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Generalidades del cultivo

2.1.1. Taxonomía de la especie *Pouteria sapota*

La historia de la aceptación de la nomenclatura de las Sapotáceas en el Neotrópico comienza en 1753 con la primera edición de Linnaeus "Species plantarum". Este trabajo incluye dos especies americanas, *Chrysophyllum cainito* y *Achras zapota* (*Manilkara zapota*), y además dos especies africanas de *Sideroxylon*. Trabajos posteriores de Linnaeus extendieron el conocimiento de las especies tropicales americanas a *Chrysophyllum oliviforme* (1759), *Achras mammosa* (= *Pouteria sapota*) y *Achras salicifolia* (= *Sideroxylon salicifolium*) (1762) (Pennington, 1990).

De acuerdo a Moore Jr. y Stearns (1967) la nomenclatura formal de zapote es la siguiente:

Familia: Sapotáceas

Género: *Pouteria*

Nombre botánico: mamey zapote, mamey colorado o zapote.

Sinónimos: *Calocarpum sapota* (Jacq.) Merr.

Calocarpum mammosum (L.) Pierre

Achras zapota (Jacq)

Sideroxylum sapota (Jacq)

Sapota mammosa

Achras mammosa

Lucuma mammosa

Calospermum mammosum

Pouteria mammosum

El nombre de mamey zapote, se originó de una confusión con el árbol de mamey (*Mammea americana* L), ya que la capa externa de ambos frutos se parece y su color interno es más o menos similar. Sin embargo, casi en la mayoría de los países se le conoce con el nombre de “zapote” ó “sapote” (Morera, 1992).

El nombre zapote se deriva del azteca “tzapotl”, el cual es un nombre colectivo que se aplica a varias especies de frutas esféricas, dulces y con grandes semillas. Gran parte de ellas pertenecen a la familia de las sapotáceas, como chicosapote (*Manilkara sapota*), mamey zapote (*Pouteria sapota*), zapote amarillo (*Pouteria campechiana*), injerto (*Pouteria viridis*) y caimito (*Chrysophyllum cainito*). El nombre zapote se usa también en especies de otras familias, como “zapote negro” (*Diospyros digyna*) y “zapote blanco” (*Casimiroa edulis*) (Morera, 1992).

En el tratamiento taxonómico más reciente, los zapotes incluyen tres especies: *Pouteria sapota*, *Pouteria viridis* y *Pouteria fossicola*, pero se admite que hay grupos intermedios entre los tres (Pennington, 1990). Aunque existen diferencias morfológicas y en algunos casos de distribución geográfica, el valor de esos tres taxones sería, si se compara con otras especies frutales, de nivel varietal (FAO, 1992).

2.1.2. Origen y distribución

El zapote es originario de las tierras bajas de Centro América, crece de preferencia en forma silvestre desde el nivel del mar hasta aproximadamente 1000 msnm. De esta región se extendió al Caribe, América del Sur, Hawai y las Filipinas. Se considera que los españoles contribuyeron a la dispersión y difusión del cultivo (Morera, 1992). Perteneció a una familia de bosques húmedos bajos, aunque algunos géneros están bien representados en Savanas y en tierras altas como en Guyana (*Ecclimusa*) y en zonas semiáridas de Centro América y las Antillas (*Sideroxylon*). En estas áreas, 50 o más especies de Sapotáceas pueden estar presentes en el dosel en una localidad sencilla (Pennington, 1990).

Mucha de la variabilidad genética del género *Pouteria* se encuentra en las áreas forestales tropicales donde aún falta exploración. Estas regiones son poco accesibles, y en ciertos casos la existencia de grupos guerrilleros en las montañas dificulta la recolección de genotipos que pueden estar en proceso de erosión genética debido al abandono en que se encuentran. Por otro lado, el desarrollo urbanístico acelera la pérdida de diversidad genética de ésta y otras especies. Es sorprendente observar cómo se talan diariamente árboles de gran valor, para instalar en su lugar edificios u otras construcciones en los mejores suelos de elevado potencial agrícola (FAO, 1992).

Los indios, en cambio, dejan los árboles de zapote al rozar la selva, y es frecuente en Guatemala encontrarlos en terrenos dedicados por largo tiempo a cultivos de maíz (FAO, 1992).

La protección de los recursos genéticos, incluyendo como ejemplo la familia de las Sapotáceas, constituye una responsabilidad internacional; en donde los costos y utilidades de dicha protección deberían compartirse de manera equitativa. Por lo general, muchos de los países con gran diversidad genética son países en desarrollo, por lo que no pueden permitirse sufragar por sí solos la protección *in situ* de recursos genéticos. Se requiere, por consiguiente, un mecanismo internacional que haga frente a los costos relativos a esta responsabilidad. Con este apoyo financiero debería atenderse particularmente a las poblaciones de especies endémicas de cada región ecológica y a las de zonas de excepcional diversidad, sobre todo en los bosque bajos, bosques pluviales tropicales y subtropicales, así como montañas aisladas, y otros lugares donde aún subsisten especies silvestres de alto valor energético. La intensificación de la agricultura ha provocado la reducción de la variabilidad genética de esta especie tropical al sustituirse los cultivares silvestres de zapote por otras especies exóticas (FAO, 1992).

2.1.3. Descripción botánica de *Pouteria sapota*.

El zapote es un árbol de gran tamaño. Puede crecer hasta una altura de cerca de 12 m en Florida, y puede exceder los 18 m en otras regiones tropicales (Balerdi *et al.* 1996), llegando a encontrarse, según Morera (1992), árboles de hasta 30 m de altura, de tronco y ramas gruesas y follaje denso (Balerdi *et al.* 1996).

Esta especie es propagada por semilla y al parecer es una planta de polinización cruzada, lo que le confiere una gran diversidad de formas y tamaños de frutos, así como variaciones en el color de la pulpa (Morera, 1992).

Las hojas son largas, de más de 30 cm de largo y 10 cm de ancho, con formas simples, ovaladas y oblanceoladas. El haz es verde brillante o con tonalidades cafés y pubescente cuando joven, sin embargo se vuelve glabro cuando madura. Las hojas están agrupadas al final de la pequeñas ramas (Balerdi *et al.* 1996; Morera, 1992).

Dependiendo del cultivar (variedad) y de la carga que haya tenido la plantación, los árboles pueden botar la mayoría de sus hojas en el invierno o en la primavera, pero desarrollan nuevas hojas rápidamente (Balerdi *et al.* 1996).

Las flores brotan en grupos numerosos, de dos a seis flores cada uno, en los nudos sin hojas de las ramillas terminales, inmediatamente debajo del follaje nuevo. Cada flor posee 8-10 sépalos imbricados, dispuestos en espiral y su tamaño disminuye progresivamente desde el más interno o basal; son más anchos que altos y a menudo recortados en el ápice. La corola es tubular, amarillenta, de 9-12 mm de largo y se abre en la parte superior en cinco segmentos o pétalos redondeados; de la base de cada uno de ellos sale un estambre. Hay además cinco estaminodios delgados en posición alterna con los pétalos, que están insertos en la corola a un nivel inferior a la inserción de los estambre. El pistilo mide unos 9 mm de largo; el ovario es muy pubescente, normalmente con cinco celdas, pero en la mayoría de los casos sólo un óvulo es fertilizado (León, 1987).

El fruto es una baya, de forma ovoide o elipsoidal y alargado ((Morera, 1992), con un cáliz persistente en la base y un remanente del pistilo en el ápice (Almeida y Martín, 1976). Su tamaño varía de 7 a 20 cm de longitud. La cáscara es delgada y fuerte, con una superficie algo rugosa y coloración pardo-canelosa; esta rugosidad es causada por las lenticelas. La pulpa de frutos maduros es de color rosado salmón, anaranjado, rojo o café-rojizo varía de texturas suaves y uniformes a finamente granulares; y es usualmente baja en fibra (Balerdi *et al.* 1996). Algunos frutos alcanzan un peso de 3 kg (Morera, 1992), aunque sus promedios varían entre 0,3-2,7 kg (Balerdi *et al.* 1996).

Normalmente, el fruto contiene una única semilla elíptica, sencilla y larga, aunque puede llegar a tener incluso cuatro. La semilla tiene una superficie café oscura, dura y brillante, con un hilo café brillante en el lado ventral. Pueden resquebrajarse y germinar en frutos sobremaduros (Balerdi *et al.* 1996).

2.1.4. Floración y fructificación

En la Florida, la estación en la que florece puede ser el verano, otoño ó el invierno, dependiendo del cultivar (variedad). Derivado de esto, cada cultivar tienen su propia estación de maduración. Por ejemplo el cultivar "Pantin" madura la mayoría de su producción en julio y agosto, con algunos frutos antes o después de estos meses. El cultivar "Magaña", madura sus frutos en marzo y abril con algunos frutos antes o después de estos meses. Los árboles pueden tener flores, frutos inmaduros y frutos maduros al mismo tiempo. Se toma de 13 a 24 meses para que el fruto alcance la madurez (Balerdi *et al.* 1996).

Los árboles provenientes de material de semilla comienzan a fructificar entre los 3 a 5 años y son muy prolíficos. Los árboles maduros pueden producir entre 200 a 500 frutos por año, llegando a obtenerse incluso en algunos árboles (árboles élités) hasta el doble de esta producción (Balerdi, *et al.* 1996).

2.1.5. Cultivares

El zapote ha sido ampliamente propagado por semillas en sus países de origen. Algunos que provienen de semillas producen alta calidad de frutos, y de estos, han sido seleccionados tipos superiores los cuales son propagados vegetativamente como cultivares promisorios o élites (Balerdi *et al.* 1996).

En la Florida, "Pantin" es considerado el cultivar más importante por unidad de área, mientras que "Magaña" es el que le sigue en importancia. El anexo 1 muestra las características de los cultivares encontrados en Florida. Diferentes cultivares producen a diferentes tiempos en el año y las plantaciones de tres o cuatro cultivares pueden alcanzar su producción durante todo el año ("Tazumal", "Magaña", "Pace" y "Pantin" (Balerdi *et al.* 1996).

En El Salvador, la variedad "Magaña" es caracterizada por poseer un tamaño de fruta de 1.5 kg, la pulpa es de alta calidad y el fruto madura en menos de un año. Esta variedad fue introducida a Florida en 1962 y ahora se cultiva comercialmente en forma vegetativa. Sin embargo, la producción por árbol no ha sido la deseada (Morera, 1992).

En la fincas de café de la parte occidental de Puerto Rico, un gran número de árboles prolíficos de zapote producen frutos grandes, que algunas veces alcanzan hasta 1 kg o más de peso y que podrían aparecer como lucrativas para validarlas y propagarlas vegetativamente (Morera, 1992).

2.1.6. Composición del fruto

La composición química-física de 100 g de zapote fresco por porción comestible se detalla en el Cuadro 1(Leung, 1961):

Cuadro 1. Composición química física por 100g de porción comestible de *Pouteria sapota*. CATIE, 1998.

Componente	100 g porción comestible
Calorías	121,0
Humedad (%)	65,6
Proteína (g)	1,7
Grasa (g)	0,4
Carbohid. Totales (g)	31,1
Fibra (g)	2,0
Ceniza (g)	1,2
Calcio (mg)	40,0
Fósforo (mg)	28,0
Hierro (mg)	1,0
Vitamina A (mg)	115,0
Tiamina (mg)	0,01
Riboflavina (mg)	0,02
Niacina (mg)	0,2
Ácido ascórbico (mg)	2,0

2.1.7. Clima y suelos

El zapote es un árbol tropical que no tolera las temperaturas de congelamiento. Los árboles jóvenes son muy vulnerables al frío y son dañados a temperaturas por debajo de 0°C. Los árboles maduros pueden resistir temperaturas de -2°C por varias horas con solamente un pequeño daño, pero mueren si la temperatura baja de -6°C por tiempos largos (Balerdi *et al.* 1996).

Crece bien en una amplia variedad de suelos, desde arcillosos pesados, franco arenosos, hasta los arenosos de tamaño medio. No tolera condiciones del suelo de constante humedad o fangosidad, ya que disminuyen el contenido de oxígeno del mismo, causando que las raíces mueran, con lo cual el árbol queda muy debilitado. Además de esto, las raíces dañadas se hacen más susceptibles al ataque de hongos del suelo (como por ejemplo *Phytium* spp.) (Balerdi *et al.* 1996).

2.2. Prácticas de Propagación

La propagación de plantas puede lograrse con una diversidad de técnicas dependiendo de la clase de planta que se trate y del propósito del propagador. Entre las técnicas más importantes se mencionan: propagación por semilla y propagación por estacas, injerto, división, separación y acodo (Hartmann y Kester, 1990)

Estos métodos de propagación, sexual o asexual, no deben ser observados como alternativas, en las cuales uno sustituye al otro, ya que cada una tiene resultados finales diferentes. Por lo tanto, es importante apreciar las consecuencias derivadas de estos dos métodos principales de multiplicación (FAO, 1992).

2.2.1. Propagación sexual

La propagación por semillas es el método primario de multiplicación de la mayoría de las plantas y es la vía principal por medio de la cual se reproduce la mayoría de las especies de frutales tropicales (Lecourt, 1989); comprende un manejo cuidadoso de las condiciones y equipo de germinación y un conocimiento de los requerimientos específicos de las semillas en particular (Hartmann y Kester, 1990).

Debido a que las especies de *Pouteria* son consideradas como plantas difíciles de propagar asexualmente, la gran mayoría de los árboles de este género en los trópicos son plantas originadas de semilla, que muestran gran variabilidad en la calidad y producción del

fruto (Malo, 1970). La falta de conocimiento acerca de la propagación asexual de este frutal ha limitado su cultivo. Se han hecho pocos estudios científicos para determinar los mejores métodos de propagación, conduciendo con esto a una pérdida de interés en el cultivo de esta especie (Campbell, 1970; Malo, 1970).

En muchas áreas estas especies son comúnmente propagadas por semilla; sin embargo, este método no es recomendado ya que los árboles toman siete o más años para comenzar a fructificar y la calidad del fruto es comúnmente mala (en cuanto a rendimientos, forma, pesos, tamaño, color y sabor de frutos), debido a que integran poblaciones de árboles muy vigorosos y genéticamente heterogéneos. Además de lo anterior presentan un período juvenil muy largo (Almeida y Martín, 1976; Malo, 1970; Odgen, 1984; Quilantan-Carreón, 1979).

En Florida, los árboles provenientes de semilla son típicamente utilizados como patrón para los cultivares deseables (Balerdi *et al.* 1996).

Las semillas deben ser colectadas de frutos maduros y plantadas inmediatamente en un medio bien drenado, ya que pierden su viabilidad de los 7 a los 14 días y no se conoce aún un buen método para su almacenamiento. Las que tienen una hendidura, como una especie de línea filamentosa en la cubierta seminal, parece que germinan más rápidamente; sin embargo, las que no poseen esa hendidura, también pueden germinar satisfactoriamente. Ese resquebrajamiento de la semilla puede ser inducido aplicando presión. Si la germinación se realiza en camas, las plántulas deben ser transferidas a contenedores conforme van creciendo y deben estar listas para injertarse después de 6 a 18 meses, cuando estas tienen una altura de aproximadamente 1 m (Balerdi *et al.* 1996).

Los frutos de árboles propagados por semilla pueden resultar muy diferentes a los padres en cuanto a peso, forma y calidad. Para usarse este método de propagación debe seleccionarse las semillas de mayor tamaño, procedentes de árboles que muestren características deseables para su multiplicación, por ejemplo: color y calidad de pulpa, alta capacidad de producción, estructura de la planta, así como árboles libres de enfermedades y

plagas (Morera, 1992). A la fecha, un gran número de árboles originados por semilla producen en Costa Rica y Nicaragua alta calidad de fruta. Esos deben ser propagados vegetativamente para minimizar el tiempo de producción y mantener la uniformidad y calidad de fruto. En Costa Rica pueden ser localizados en Alajuela, Orotina, San Mateo, Esparza, Filadelfia, Sarapiquí, Guácimo, Siquirres, Talamanca y en Nicaragua, en las regiones de León, Rivas, Chinandega y Masaya (Morera, 1992).

2.2.2. Propagación asexual

Es la reproducción por medio de partes vegetales de las plantas, tales como raíces, ramas u hojas. La propagación asexual no implica cambio en la constitución genética de la nueva planta. Todas las características de la planta madre se presentan en la nueva planta, ya que durante la mitosis tiene lugar una duplicación exacta del sistema cromosómico; aunque factores como clima, tipo de suelo, o ataque de enfermedades, pueden modificar su apariencia, flores o frutos, de modo que aparezcan diferencias, aunque no hayan ocurrido cambios genéticos (Hartmann y Kester, 1990)

Este tipo de propagación representa una alternativa valiosa para la producción masiva de material para plantar, sin depender de las variaciones típicas asociadas a la producción de semilla. Además, al contrario de la reproducción por semilla, que aprovecha sólo la porción aditiva de la varianza genética, la propagación asexual permite capturar y aprovechar la varianza genética total, lo cual resulta en aumentos significativos en la productividad y la calidad de las plantaciones forestales a muy corto plazo (Libby y Rauter, 1984; Leakey, 1987). Los árboles obtenidos por este medio son un instrumento de investigación importante ya que como son genéticamente uniformes, se pueden separar los efectos producidos por el medio ambiente de aquellos efectos que son producto de cambios internos del árbol (Longman, 1993).

Con este tipo de propagación se ofrece la oportunidad de solventar rápidamente el problema de la pérdida y erosión del acervo de genes natural de un rango de especies importantes (Leahey *et al.*, 1982).

De acuerdo con Quintaleon-Carreón (1979), en zapote es necesario considerar este tipo de propagación como un factor importante en el establecimiento de plantaciones, ya que con esto y la utilización de clones sobresalientes, se evitarían los problemas que trae consigo la propagación por semilla. A pesar de lo anterior, se tiene que esta especie es difícil de propagar vegetativamente; sin embargo, con una atención adecuada y con esfuerzos repetidos y detallados, pueden ser alcanzadas altas tasas de multiplicación (Balerdi *et al.* 1996).

2.2.2.1. Propagación por estacas

Por varias décadas el uso de estacas ha sido conocido como el mejor método de propagación asexual, y es uno de los métodos más fáciles de utilizar (Almeyda y Martín, 1976, Hartman y Kester, 1990). Más del 80% de los árboles tropicales con los que se han realizado pruebas pueden enraizar como estacas de tallo con hojas, en polipropagadores de baja tecnología y/o bajo aspersión, crecer en un vivero y plantarse como plantas de semilleros (Longman, 1993).

Las estacas ofrecen una serie de ventajas: la planta resultante es genéticamente idéntica a la planta madre, el costo de la propagación es usualmente bajo, la técnica es simple y no hay problemas de incompatibilidad como en el caso de injertación; el mayor obstáculo en el caso de muchas especies es la dificultad para estimular la producción de raíces (Almeyda y Martín, 1976), ya que la capacidad de enraizamiento por medio de estacas de tallos varía entre las diferentes especies y procedencias (Hartmann y Kester, 1990).

En este tipo de propagación una parte del tallo, raíz u hoja es cortada de la planta progenitora, después de lo cual se coloca en ciertas condiciones ambientales apropiadas (temperatura, luz, humedad, etc) y se induce a formar raíces y ramas, produciendo así una

nueva planta independiente, la cual en la mayoría de los casos es genéticamente idéntica a la planta original (Hartmann y Kester, 1990).

Aquí no interviene la acción conjugada de los dos progenitores, como ocurre en el caso de la multiplicación por semilla. Un solo y único vegetal puede multiplicarse por fragmentación en varios individuos: es lo que se denomina multiplicación vegetativa. El conjunto de individuos así obtenidos a partir de una misma planta constituye un clon (Lecort, 1989).

Estas estacas pueden clasificarse en varias categorías:

- a) Según la naturaleza del órgano separado (rama, brote, raíz, hoja, etc)
- b) Según su estado (lignificado o herbáceo): una limitante para la utilización de estacas enraizadas ha sido su dependencia de la edad; los árboles jóvenes suelen enraizar con una rapidez mayor, pero es casi imposible enraizar los mismos árboles cuando están maduros (Zobel y Talvert, 1992).
- c) Según la época en que se realice la operación (invierno, primavera, verano, otoño)
- d) Según los diversos tratamientos que puedan darse a la estaca (Lecort, 1989).

Para la selección de las estacas hay que considerar un conjunto de aspectos, ya que el desarrollo radical adventicio está influenciado por un rango de procesos fisiológicos (Leakey *et al.*, 1994) entre los que se encuentran: hábito de ramificación, forma del tallo, velocidad de crecimiento, aspectos producto de la genética de la especie, cambios del árbol mientras crece y envejece y el medio ambiente, que afectan al árbol produciendo en éste una pérdida de la habilidad de enraizamiento, ramas inadecuadas para la propagación, reducción en el vigor de crecimiento, etc. Para tratar de minimizar la variación existente se deben seleccionar estacas

que tengan buenas procedencias, progenitores y clones, así como un manejo de las plantas donantes, ya que la mayoría de árboles tropicales necesitan el manejo de dichas plantas para obtener los beneficios de la propagación vegetativa y la selección clonal (Longman, 1993).

Otro aspecto muy importante es el ambiente en el cual las estacas son puestas a enraizar, el cual es crítico para lograr el éxito y debe ser tal que evite cualquier posible estrés a las mismas. Según Leakey *et al.* (1994) existe una interacción entre los anteriores aspectos fisiológicos y el ambiente en el cual las estacas se encuentran. De estos el más importante de evitar es el estrés hídrico, ya que el mismo acto de cortarlas las priva de su fuente de agua (las raíces de la planta madre), dejándolas muy propensas a la desecación. Para minimizar el estrés que sufre es necesario transferirla rápidamente a una condición húmeda y fresca y de esta manera lograr que haya una minimización de éste (Leakey y Mesén, 1993).

Las estacas normalmente son obtenidas de brotes que están fotosintetizando y transpirando activamente, por lo tanto, debe haber una optimización de la fotosíntesis durante el proceso (Leakey *et al.*, 1990; Mesén, 1993).

Entre los aspectos a considerar en el ambiente aéreo se encuentran:

- a) Temperatura: en especies tropicales, la temperatura óptima del aire para favorecer enraizamiento es de 20-25°C, aunque temperaturas mayores de hasta 30°C son aceptables siempre y cuando se mantenga una humedad relativa muy alta (más de 95%). Para lograr estas condiciones, generalmente es necesario utilizar sombra en el área de propagación. Las bajas temperaturas son necesarias por dos razones: i) las tasas de evaporación son menores, y ii) la capacidad de retención de agua del aire (humedad) es dependiente de la temperatura, por lo que ayudan a evitar el estrés hídrico al mantener una humedad relativa alta (Leakey y Mesén, 1993).

b) Humedad: una alta humedad es esencial para evitar el estrés hídrico en las estacas. Por lo general, entre más alta sea la humedad es mejor. Entre los sistemas que se utilizan para mantener una adecuada humedad se encuentran:

1. Sistema de aspersión: este es tal vez el método más comúnmente utilizado para evitar el estrés hídrico. Involucra la aspersión intermitente de las estacas con gotitas muy finas de agua. El tamaño de la gota está determinado por la presión de la fuente de agua.
2. Sistemas sin aspersión: es un sistema muy simple y de baja tecnología que no requiere un suministro de agua de cañería ni electricidad. El propagador es básicamente una caja rodeada de plástico transparente que retiene el agua (con un marco de madera) dentro de la cual se satura con agua las capas de piedras y grava, encima de los cuales se coloca el sustrato para enraizamiento (Leakey y Mesén, 1993).

Se ha encontrado que el estatus hídrico está gobernado por el balance entre las pérdidas por evaporación de las hojas y la toma de agua por las estacas. Así, se tiene que la pérdida de agua es directamente proporcional a la presión de vapor de agua entre la hoja y el aire circundante (Guy y Loach, 1977; Rawson *et al.*, 1977)

- c) El sustrato de enraizamiento: se puede utilizar una gran variedad de sustratos para la propagación; básicamente estos deben ser limpios (aunque no necesariamente estériles), húmedos y bien aireados. Estos requerimientos pueden lograrse con arena gruesa o grava fina. Si la capacidad de retención de agua es baja, esta se puede aumentar mediante la adición de aserrín, turba, vermiculita, etc. No obstante, esto se logra a expensas de la aireación (Leakey y Mesén, 1993).
- d) Ayudas hormonales que favorezcan la iniciación y desarrollo de raíces (Hartman y Kester, 1990, Loach, 1988; Leakey *et al.*, 1990).

Además de los factores anteriormente mencionados, la posición nodal de los brotes influencia el enraizamiento de estacas de tallos de varias especies de árboles (Leakey, 1983; Henry *et al.*, 1992).

También se ha investigado que una incisión en la base de las estacas de tallos puede mejorar la capacidad su enraizamiento (Wells, 1962; Henry *et al.*, 1992; Palzkill y Feldman, 1993).

Aunque se ha mencionado mucho la variación de la habilidad de enraizamiento de especies leñosas los factores para la comprensión de esa variables son ampliamente desconocidos o muy poco entendidos (Wilson, 1994); en dicha situación, la identificación y entendimiento de los factores que limitan el enraizamiento es crítico para una propagación que quiera ser exitosa (Leakey *et al.*, 1994).

Con respecto a *Pouteria sapota*, en pruebas de enraizamiento llevadas a cabo por Guevara (1977) se utilizaron ramas del último ciclo de crecimiento, que fueron divididas en tres partes con el fin de obtener estacas provenientes de las secciones apical, media y basal del brote. A cada estaca se le dejó la hoja superior, la cual fue reducida a la mitad con el objeto de evitar la deshidratación y favorecer la fotosíntesis hasta que se produjera el enraizamiento. Los resultados mostraron la formación de raíces de tres estacas de la región basal del brote, cuando se utilizó una dosis de 500 ppm de ácido indol butírico.

En el MITA (Mayagüez Institute of Tropical Agriculture, Mayagüez, P.R) se han hecho estudios para observar la posibilidad de la propagación de zapote a partir de estacas de tallos. En estos estudios fueron utilizadas ramas terminales maduras de crecimiento reciente. Las estacas tenían una longitud de 15 a 20 cm en donde las hojas fueron cortadas a la mitad para reducir la tasa de transpiración. Estas estacas fueron tratadas con ácido indol butírico. Se plantaron en un medio de arena fina y se observó que a pesar del desarrollo de callo algunas veces, ninguno de los tratamientos produjo raíces (Almeyda y Martín, 1976).

2.2.2.2. Propagación por injertos

Además de los métodos de multiplicación vegetativa por estacas, la injertación es otro sistema que integra la unión de una planta a otra (Lecort, 1989)

Este método consiste en juntar partes de plantas, de manera tal que se unan y continúen su crecimiento como una sola planta. La parte de la combinación que va a sustituirse en la parte superior de la nueva planta se le llama púa, aguja o vareta; y a la parte que va a constituir la porción baja o raíz se le llama patrón, pie o portainjerto (Hartmann y Kester, 1990).

Para el caso del zapote, la injertación es muy conveniente porque los genotipos más deseables y de mayor producción fructifican en la mitad del tiempo que cuando se propagan por semilla (Morera, 1992). Sin embargo, muchos autores consideran esta especie difícil de propagar, además de que la región no cuenta con una metodología para su propagación masiva (Almeyda y Martín, 1976; Campbell, 1967; Quilantan-Carreón, 1979); y hasta 1920 se daba por desconocido un método para propagar a esta especie (Popenoe, 1979). Adicionalmente, otro problema al que se enfrenta la injertación es que es un proceso que requiere de mano de obra capacitada (Lecort, 1989).

2.2.2.2.1. Ventajas de la injertación

- Conservar plantas con características deseables y provocar precocidad en la producción de frutos.
- Patrones bien seleccionados pueden corregir problemas de patógenos en su base y sistema radical que presentan ciertos genotipos de buena calidad
- Adicionalmente se combinan características del patrón (vigor) con cualidades importantes “impresas” en la vareta.

- Permite programar plantaciones más uniformes tanto para el desarrollo estructural-fenotípico, como para organizar las secuencias de producción (Umaña, 1997).

2.2.2.2.2. Conocimientos previos para el éxito en la injertación

Al igual que en otras especies frutales, en zapote, no todas las selecciones presentan el mismo comportamiento en el prendimiento de la vareta al patrón. Como ejemplo, la selección "CATIE 10617-1" ha sido injertada sobre diferentes procedencias de patrones y el éxito en el prendimiento es de un 30-50% mientras que en "CATIE 10669-3" y "12007-1" los prendimientos oscilan entre 90 y 100% utilizando los mismos métodos y procedimientos que en la primera (Umaña, 1997).

En ensayos recientes, llevados a cabo sin un diseño experimental, se observó que lo que determina el grado de prendimiento en la injertación es la vareta o selección que se está propagando y no el patrón. Por lo anterior, previo al desarrollo de cualquier proyecto se debe determinar el grado de compatibilidad del genotipo o selección clonal a multiplicar (Umaña, 1997). Solamente el *Pouteria sapota* ha probado tener éxito como patrón para injertación en esta especie; otra especie como sapodilla (Gonzales y Favella, 1952) ha sido evaluada como patrón, pero los injertos no han sido compatibles. Al respecto, ensayos llevados a cabo por Ogden y Campbell (1980) mostraron que existe compatibilidad en el injerto de zapote sobre canistel (*Pouteria compechiana*. (HBK)Baekni) utilizando la técnica de enchape lateral, pero mencionan que se requiere mayor investigación. De acuerdo a Campbell y Lara (1992) no se han encontrado publicaciones que mencionen la utilización del injerto verde (*Pouteria viridis*. (Pitt.) Cronquist) como patrón, aunque en Florida se ha observado compatibilidad de injertos de injerto verde en patrones de zapote.

Las plantas jóvenes de mamey colorado usadas como patrones en los viveros, muestran una yema terminal grande y generalmente carecen de ramas o crecimiento laterales hasta que la planta alcanza aproximadamente 2 m de altura. En experimentos conducidos en patrones, la remoción de las yemas terminales rompió el mecanismo de dominancia apical y produjo un

mayor porcentaje de injertos logrados. Los experimentos incluyeron injertos realizados durante los períodos considerados óptimo y subóptimo. La remoción de las yemas terminales mostró el mayor éxito en los injertos realizados durante el verano, período de crecimiento más activo, en el cual los injertos generalmente no prenden (Odgen y Lara, 1984; Rodríguez y Guardian, 1985).

Pese a que se ha avanzado mucho en los métodos de injertación, el zapote sigue siendo la excepción y paralelo a otros factores que se citan más adelante, el método a aplicar es esencial para el éxito en la injertación: tanto el xilema de la vareta como el del patrón no debe ser profundizado en el corte pre-uni6n de los dos cambium vasculares y el sistema de corte es para injertar en el estilo púa o enchape lateral, de manera que los cambium vasculares de la vareta y el patr6n deben quedar en contacto íntimo la mayor cantidad de área posible (Umaña, 1997). Campbell *et al.* (1984) mencionan que una modificaci6n del injerto de enchapado lateral en combinaci6n con días calurosos, noches frescas y baja humedad, fue determinada como lo mejor condici6n para injertar el zapote bajo las características del sur de Florida. Resultados preliminares con la técnica del injerto de enchape lateral en plántulas jóvenes colocada bajo condiciones de neblinado y examinados después de 2-3 meses, parecen promisorios, pero aún así, más experimentos tienen que ser efectuados para ver si el porcentaje de éxito en injertos laterales puede ser incrementado durante los meses más fríos, y que este sistema sea justificable económicamente a una escala comercial.

2.2.2.2.3. Factores importantes a considerar en la injertación del zapote

Una limitante a tomar en cuenta y uno de los factores más importantes en la injertación de zapote es el estado fisiológico del árbol suplidor de la vareta. En dicho frutal, son característicos tres estados fenológicos respecto al componente foliar:

- a) Defoliado en un 75%-90% con la yema apical cerrada e hinchada.
- b) Follaje nuevo con yema apical abierta.
- c) Follaje maduro o adulto con yemas apicales cerradas.

De acuerdo a los anteriores estados fisiológicos que pueden encontrarse en el árbol se ha informado de varias formas de preparar la varetta. Campbell (1967) y (Umaña, 1997) recomiendan que la yema apical esté abultada y a punto de abrirse, mientras que Lazo (1965) recomienda eliminar la punta de la rama hasta donde tenga hojas y a los 10 días, cuando las yemas laterales broten, es cuando debe de cortarse la varetta. Malo (1970) encontró que varetas preparadas a través de defoliación, anillado y aspersión de reguladores de crecimiento por diferentes períodos antes de cortarse y en varias épocas del año no influenciaron el prendimiento de los injertos en Florida. De acuerdo con lo anterior, Odgen (1984) y Rodríguez Guardián (1985) recomiendan que cuando se injerte no se utilice púas maduras tomadas de árboles adultos, ya que el prendimiento disminuye considerablemente, si se compara con púas juveniles obtenidas de las porciones terminales de plantas jóvenes o cuando se injertan púas “juveniles” provocadas por medio de la poda. Odgen (1984) atribuye este comportamiento al hecho de que las púas maduras tienen un cambium vascular irregular rodeado por bandas de fibras tanto externas como internas. Esto hace difícil lograr un contacto íntimo entre la zona cambial del patrón y el de la púa. Además menciona que las púas maduras contienen una mayor concentración de sílice que de almidón en la región cortical, lo que dificulta el transporte del agua en la zona del injerto. El sílice también endurece las células de la púa haciendo que se desgarran al hacer los cortes para injertar, lo que interfiere con el prendimiento de los injertos.

Autores como Rodríguez y Guardián (1985) recomiendan un anillado de las púas tres semanas antes de injertarlas ya que esto ejerce un efecto positivo sobre el prendimiento de los injertos de aproximación, aunque no así sobre los injertos de enchapado lateral. Según Malo (1970), este efecto se puede atribuir a que cuando se anillan las púas antes de injertarlas, se acumulan carbohidratos en la sección distal de las ramas, que es el lugar que ocupan las púas. Las reservas aumentan y las púas se tornan más vigorosas, razón para un mayor prendimiento de los injertos con púas anilladas.

También es necesario considerar la época del año en la que se efectúa la injertación; esto corresponde a las condiciones encontradas de marzo a mayo y de octubre a noviembre; sin embargo, algunos injertadores experimentados lo hacen durante el verano y algunos injertan todo el año (Balerdi *et al.* 1996)

Comúnmente son utilizadas ramas terminales por los propagadores comerciales. La preparación de la vareta para la injertación involucra un anillado de la rama entre 25,4 cm a 30,5 cm debajo del extremo terminal, entre las 2 a 3 semanas antes de que la injertación se lleve a cabo. Debe haber una remoción de las hojas, dejando una pequeña sección del peciolo para estimular el crecimiento de las yemas que se encuentran en las axilas de la hoja. Con respecto a estas yemas, Campbell *et al.* (1984) mencionan que las plantas de zapote que crecen en viveros o campos, exhiben una fuerte dominancia apical. En plantas jóvenes y adultas, las yemas axilares son tan pequeñas que es difícil determinar si están suficientemente desarrolladas para su uso en diferentes tipos de injertos.

Después de que las varetas con sus respectivas yemas han sido removidas del árbol, pueden ser utilizadas para la injertación entre 5 a 7 días. Sin embargo, la injertación debe ser hecha lo más pronto posible (Balerdi *et al.* 1996). De acuerdo a Quintalleon-Carreón (1979), con la técnica de enchapado lateral se pueden lograr porcentajes de prendimiento de 80 a 90% en patrones de 12 meses de edad, siempre que la vareta utilizada provenga de árboles totalmente defoliados en la época seca, que va de febrero a mayo, y que la altura de la base del injerto se coloque de 10 a 30 cm del suelo.

En una investigación llevada a cabo en Guatemala por Granados (1992) con el fin de mejorar el prendimiento y brotación en zapote (*Calocarpum sapota*) se aplicó en forma combinada ácido indolacético (AIA) 5 mg l⁻¹, ácido giberélico (GA₃) 30 mg l⁻¹ y cinetina (Kin) 10 mg l⁻¹, en mezclas de dos o tres reguladores y disueltas en lanolina. El experimento se estableció a la intemperie, y se injertaron yemas sobre patrones de cinco meses de edad. A los 66 días de su aplicación, los mayores porcentajes de brotación se obtuvieron al mezclar AIA + GA₃ + Kin ó GA₃ + Kin (80 y 73%, respectivamente), mientras que el testigo apenas alcanzó

un 43%. El crecimiento promedio de los brotes con la aplicación de los tres reguladores fue de 11,3 cm superior al del testigo (3,6 cm). La mezcla AIA, GA₃ y Kin promovió la brotación y estimuló el crecimiento de yemas injertadas.

Una alternativa para aumentar el éxito en la injertación es producir nuevos brotes jóvenes por medio de una poda selectiva de ramas maduras de los cultivares deseables. La poda estimula el crecimiento de numerosos brotes laterales que crecerán vigorosamente. Estos brotes son de apariencia juvenil, por su rápido crecimiento y falta de floración. Los extremos terminales de 20-30 cm, de este crecimiento de apariencia juvenil son los mejores portainjertos (Balerdi *et al.* 1996).

Otro aspecto importante en zapote son las cantidades enormes de látex, que ha sido sugerido como la razón para el poco éxito que tienen las injertaciones. La formación de tejidos a partir de la herida y de callos es muy lenta en sapote, lo cual también ha sido sugerido como un factor en los problemas de injertación (Campbell *et al.*, (1984); Almeyda y Martín (1976), Lazo (1965), Quilantan-Carreón (1979), Rodríguez y Guardian (1979)).

Al comparar los resultados del porcentaje de prendimiento, se observa que cuando se tomó la vareta de un árbol próximo a defoliarse se obtuvo 78 %, mientras que cuando se tomó varetas de un árbol totalmente defoliado se obtuvo 98 %; esto se debe a que en este caso no había secreción de látex al momento de efectuar los cortes, esta observación puede ser útil para viveristas de regiones donde haya estación seca y húmedas bien definidas, ya que el látex es muy abundante en la época húmeda y su contenido en las varetas disminuye en la época seca durante el período de defoliación del árbol (Quilantan-Carreón, 1979).

Algunos autores como Malo(1970) y Odgen y Campbell (1980), sin embargo, consideran que la presencia de látex no parece ser un factor en el éxito o fracaso de la unión del injerto.

2.2.2.2.4. Tipos de injertos

2.2.2.2.4.1. Injerto de enchape lateral

La injertación por medio de enchape lateral es el método comúnmente empleado para la propagación en zapote (Balerdi *et al.*, 1996; Odgen y Campbell, 1980; Umaña, 1997), aunque, Malo (1970) obtuvo hasta un 100 % de prendimiento con el método modificado de aproximación usado en Tailandia, el cual podría ser utilizado y considerado para explotaciones comerciales. Resultados similares fueron obtenidos por Rodríguez y Guardian (1985), en donde el injerto de aproximación modificado tuvo más éxito que el de enchapado lateral.

Las varetas deben ser colectadas y utilizadas el mismo día. Si los extremos terminales no han endurecido, las varetas subterminales deben ser preparadas por remoción de yemas terminales y esperar hasta que las yemas laterales empiecen a crecer. Deben además tener una longitud de 2 a 7 cm. Para injertar, se hace un corte superficial con una longitud de 2 a 7 cm, a través de las capas de cambium, teniendo mucho cuidado de no incluir ninguna porción de madera. Después se hace un corte oblicuo en el lado reverso del esqueje (Anexo 2) (Umaña, 1997).

En el patrón se hace un corte superficial de longitud y diámetro similar, de 10 a 20 cm arriba de la línea del suelo, , dejando una pequeña tira de tejido en la parte más baja con el fin de cubrir el corte oblicuo de la vareta (Balerdi *et al.* 1996).

Después de que la vareta y el patrón están unidos, la cinta para injertar (polietileno) es utilizada para envolver y cubrir totalmente el injerto; luego se colocan las plantas a 50% de sombra. Usualmente la unión del injerto puede formarse después de 3 a 7 semanas, tiempo en el cual la cinta injertadora ha sido removida por las yemas que han comenzado a crecer. Las plantas injertadas pueden entonces ser expuestas a un incremento en la luz del sol (Balerdi *et al.* 1996).

2.2.2.2.4.2. Injerto de púa

El injerto de púa es uno de los métodos de injertación más antiguos y ampliamente utilizados, el cual es adaptable para toda parte del árbol, ya sea en el tronco de un árbol pequeño o en las ramas más altas de un árbol alto. Este tipo de injerto es útil también para plantas pequeñas, como en los injertos de corona establecidos en uvas camelias. En árboles, este método debe ser limitado a ramas con diámetros de 2,5 a 10 cm. Además, el injerto de púa puede ser hecho en cualquier tiempo durante la estación dormante, pero los resultados más exitosos de la unión del injerto son obtenidos justo cuando las yemas están comenzando a hincharse, pero antes que el crecimiento activo ha comenzado. Si el injerto es hecho después que el árbol está en crecimiento activo, la corteza se separa de la madera, causando dificultades en obtener una buena unión (Anexo 3) (Hartmann y Kester, 1990).

En este tipo de injerto se hace una hendidura vertical con una navaja de injertar por una distancia del centro hacia abajo de 5 a 8 cm del tocón que va a ser injertado. La hendidura debe ser más en dirección tangencial que en radial en relación al centro del árbol. Esto permite un mejor acoplamiento de la vareta para su crecimiento posterior (Hartmann y Kester, 1990).

Investigaciones realizadas en zapote por Guevara (1977) mostraron que utilizando este tipo de injerto se obtuvo hasta un 40% de prendimiento, encontrándose que en esta especie hay un desarrollo temprano y profundo de la peridermis, presencia de células pétreas, aparición temprana de crecimiento secundario, presencia de conductos resiníferos en el floema y en la corteza, así como fibras en el protofloema, lo que según autores como Campbell y Lara (1992) constituyen factores anatómicos y morfológicos que afectan el éxito en los métodos de propagación de esta especie.

2.2.2.3. Cultivo de Tejidos

El cultivo de tejidos y células vegetales es una parte de la biotecnología que en la actualidad tiene una rápida evolución. La velocidad con la cual se están alcanzando nuevos conocimientos hace difícil poder dar una síntesis completa y concisa de estas técnicas. Por cultivo de tejidos *in vitro* se entiende el conjunto de técnicas y metodologías que permiten el cultivo de partes de una planta tales como órganos, tejidos, células o simples protoplastos lo que se denomina explante en una recipiente que contiene sustancias nutritivas en condiciones de esterilidad y en ambiente controlado (Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991).

La capacidad de ciertos tejidos vegetales, como el callo y las suspensiones de células, así como aquella de varios órganos de plantas tales como tallos, flores, raíces y embriones (semillas) de crecer de manera más o menos indefinida, se ha utilizado como un instrumento de investigación por genetistas, botánicos y fitopatólogos. A estos métodos se les ha llamado colectivamente cultivo de tejidos, una expresión que en ocasiones se usa como sinónimo de micropropagación (Hartman y Kester, 1987).

La micropropagación *in vitro* no es más que una propagación clonal que ocurre en condiciones controladas y de total asepsia, con el empleo de cultivos artificiales (Bonga y Aderkas, 1992).

El cultivo de tejidos como un medio asexual de reproducción presenta múltiples ventajas, entre la que se encuentran (Hartmann y Kester, 1987):

1. Propagación en masa: se caracteriza por las tasas potencialmente altas de multiplicación de clones que pueden lograrse en un tiempo relativamente corto.
2. Propagación continua durante todo el año: lo que permite a los propagadores operar durante todo el año con la producción programada en forma más ajustada a las ventas.

3. Control de organismos patógenos: el control de organismos patógenos en las plantas madres se facilita con los sistemas *in vitro*, pero se deben incluir como parte del procedimiento las pruebas necesarias para detectar organismos patógenos conocidos, como virus y bacterias.
4. Conservación e intercambio de germoplasma.
5. Producción de metabolitos secundarios: actualmente el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* constituye una alternativa para producir sustancias de uso farmacéutico, agrícola o industrial cuya producción comercial por los métodos convencionales resulta difícil o económicamente poco viable.

Aunque la micropropagación también presenta muchas ventajas, tiene sus problemas. Las instalaciones necesarias son costosas y en muchas especies las consideraciones económicas posiblemente no justifiquen su empleo comercial. Para efectuar las operaciones, se necesita adiestramiento específico. Los errores en identidad, introducción de organismos patógenos desconocidos o la aparición de un mutante desapercibido puede multiplicarse a una escala considerable en un tiempo muy corto. Se requiere una verificación del cultivar que se maneje. En algunos cultivares y con ciertos sistemas de cultivo se pueden originar clases específicas de modificaciones genéticas y epigenéticas que pueden alterar las plantas producidas. En un programa de micropropagación se debe tener conocimiento de estos problemas potenciales y efectuar una evaluación de sus efectos en la producción de ciertas variedades (Hartmann y Kester, 1987).

2.2.2.3.1 Propagación *in vitro* de árboles frutales.

Este método da al mejorador de especies frutales la oportunidad de incrementar fácilmente nuevas selecciones y de esta manera poder ser evaluadas en condiciones de campo lo más antes posible. La micropropagación puede ser efectuada de diferentes maneras.

Comúnmente se utilizan explantes del ápice, punta de los brotes o yemas, las cuales son inducidas a crecer y proliferar en cultivo. Una vez que un número suficiente de brotes ha sido producido, estos son enraizados en el invernadero, hasta obtener las plantas deseadas (Zimmerman, 1983).

A diferencia de las especies anuales y bianuales, las especies perennes han mostrado mayor grado de dificultad para su micropropagación. Hoy en día, aún cuando se han logrado algunos adelantos importantes, sobre todo en coníferas, en la mayoría de los casos se ha empleado tejidos jóvenes como fuente de explante, ya que los tejidos y órganos maduros son poco sensibles a las condiciones *in vitro*. Un principio básico en el cultivo *in vitro* de especies arbóreas es que mientras más joven es el tejido y se encuentre en crecimiento activo, mejores resultados se obtendrán en el proceso de diferenciación de órganos (Bonga y Von Aderkas, 1992).

Muchas de las aplicaciones de la propagación por medio de cultivo de tejidos en árboles leñosos en la década pasada, se han realizado en cultivos hortícolas. De estos, los frutales fueron los primeros en los cuales fue iniciada la producción a gran escala. La producción del enraizamiento *in vitro* de manzanas y duraznos fue quizá la primera y más importante aplicación de los métodos de cultivo de tejidos a los cultivos hortícolas leñosos (Zimmerman, 1985).

Como factores constantes que limitan la producción de estos cultivos se encuentran las condiciones del trópico, enfermedades, insectos y el estrés ambiental. El monocultivo de unos pocos cultivares de árboles frutales tropicales en grandes explotaciones comerciales ha generado frecuentemente grandes desastres. Lo anterior debido a la base genética estrecha de muchos cultivares; por lo tanto, no hay una protección genética contra muchas de las enfermedades. Avances en cultivo de tejidos y en embriogénesis somática para el mejoramiento de los cultivos, han demostrado que esta técnica tiene un potencial considerable para el mejoramiento de muchos cultivos agronómicos. Sin embargo, ha sido difícil encontrar las vías de regeneración *in vitro* para las plantas perennes leñosas, por la aparente pérdida de

potencial regenerativo en los tejidos maduros de plantas leñosas (Bonga y Von Aderkas, 1992). A pesar de que se ha demostrado la desdiferenciación en callos derivados del cultivo de embriones y del material proveniente de semillas de varias especies de árboles, los callos derivados de explantes de origen maduro han perdido mucho su potencial regenerativo. Con el fin de restablecer el potencial de regeneración *in vitro* de los tejidos de árboles maduros, el árbol debe ser rejuvenecido (Driver *et al.* 1984).

El tamaño del árbol y la longevidad son también un impedimento. Por ejemplo, si se desea establecer el cultivo de tejidos de un árbol maduro, generalmente se es más dependiente del material del campo que del material que crece en un invernadero, ya que no se tiene control de las condiciones climáticas a las cuales los árboles están expuestos en el campo (Bonga y Von Aderkas, 1992).

Uno de los aspectos más importantes en el cultivo *in vitro* de especies de vida larga es la selección del explante, ya que estas junto con un adecuado estado de desarrollo, es con frecuencia crucial para el éxito en la micropropagación (Bonga y Von Aderkas, 1992).

Murashige (1972) ha propuesto tres pasos fundamentales para micropropagar eficientemente una especie, ya sea herbácea o leñosa:

- 1) establecimiento aséptico del cultivo
- 2) su multiplicación
- 3) enraizamiento y la preparación del explante para su trasplante al suelo.

Una vez seleccionado el mejor explante, se requiere desinfectarlo superficialmente, ya que en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que competirán ventajosamente con el explante. Para esta desinfección se utilizan diferentes compuestos, siendo los más comunes las soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el cloro comercial, el alcohol a diferentes concentraciones y otros. La selección y concentración de los desinfectantes y el tiempo de desinfección se determinan, en gran medida, por las características del explante; en la práctica,

se establecen experimentalmente por ensayo y error. El explante debe responder eficientemente bajo las condiciones *in vitro*. Es importante considerar el hecho de que el aislamiento de un tejido u órgano del resto de la planta provoca un estado de estrés que altera su metabolismo celular y, en forma importante, su balance hormonal. Un buen explante es aquel cuyas células sobreviven en una alta proporción a la descomposición antes señalada, y que luego responde eficientemente a las condiciones *in vitro* (Roca *et al.*, 1991)

En estado de crecimiento, el explante se multiplica con la formación de callos o sin ella, según las condiciones de cultivo. La fase intermedia de formación de callos se evita cuando se tienen fines de micropropagación debido al hecho, ya ampliamente conocido, de que las plantas provenientes de callos presentan diferentes grados de variación, que puede ser de tipo epigenético o corresponder a mutaciones verdaderas (Roca *et al.*, 1991)

2.2.2.3.2. Cultivo de ápices *in vitro*

El desarrollo de ápices y meristemas en medios artificiales ha contribuido significativamente al conocimiento y aplicación práctica en tres aspectos: a) morfogénesis, aislando únicamente el domo o incluyéndole primordios foliares y/o florales; b) multiplicación masiva de clones, y sobre todo; c) obtención, conservación y establecimiento de individuos y poblaciones de plantas libres de patógenos (Villalobos, 1985).

Los ápices tienen algunas ventajas respecto a otros inóculos (callosidades, fragmentos de hojas, etc.), ya que en ocasiones están libres de patógenos, además de llevar cierto adelanto de diferenciación, lo que garantiza la retención de las características genéticas del individuo donador y obtención de la progenie en menor tiempo, que cuando se parte de callos, hojas o trozos de tallo (Villalobos, 1985)

La regeneración de plantas partiendo del cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos de ciertos vegetales leñosos, exige la búsqueda de técnicas complejas y su empleo acertado. Esas técnicas deben permitir al explante sortear frecuentes dificultades como la oxidación, la

heterogeneidad de respuesta, la reversión al estado juvenil, la presencia de inhibidores de enraizamiento y, sobre todo, la sobrevivencia al trasplante en condiciones autótrofas (Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991).

En una investigación llevada a cabo por Roca (1996), se estudió la respuesta de las puntas terminales de zapote al cultivo *in vitro* utilizando dos medios basales de cultivo y tres tipos diferentes de reguladores del crecimiento en diferentes concentraciones. La técnica propuesta consistió en el alargamiento y desarrollo de meristemas terminales dada las ventajas que esta presenta para la formación y conservación de clones con un escaso nivel de variabilidad. El explante fue seleccionado con base en la adecuada disponibilidad del mismo, su facilidad de manejo, pruebas preliminares y tipo de respuesta que se pretendía. La siembra de extremos apicales sobre medios líquidos de inducción presentan una menor acumulación de sustancias en la zona de corte del explante por lo que presentó una menor fenolización. El medio basal MS (Murashige y Skoog) tanto en medios de inducción como en medios de desarrollo presenta un mayor porcentaje de respuesta sobre el crecimiento del explante que el medio basal WPM (wood plant medium); las puntas terminales respondieron al alargamiento y desarrollo de brotes en diferentes tratamientos, de los cuales el mejor en cuanto a porcentaje de respuesta y tamaño del brote fue el tratamiento que incluyó un medio líquido de inducción suplementado con 1 mg l^{-1} de GA3 y un medio de desarrollo con 2 mg de BAP y 0,5 mg de ANA con medio basal MS. Sin embargo, todos los brotes producidos poseían hojas vitrificadas, lo que limitó el alargamiento y desarrollo de las mismas.

2.2.2.3.3. Microinjerto *in vitro* de especies frutales.

Siguiendo los primeros ensayos de Ball (1946) y Morel y Martín (1952), citado por Jonard *et al.* (1983), la regeneración de plantas completas del cultivo de ápices ha sido exitoso solo para numerosas especies herbáceas (Quak, 1977). La aplicación de esta técnica a plantas leñosas es más difícil (Jones y Vine, 1968); además solamente pocos resultados han sido obtenidos con árboles frutales, por ejemplo, 38 especies o cultivares de *Prunus*, almendras e

híbridos de almendras y duraznos (Tabachnik y Kester, 1977), así como en árboles de manzana (Walkey, 1972; Abbott y Whiteley, 1976).

La microinjertación ha sido aplicada en aspectos como rejuvenecimiento, eliminación de virus y en el estudio de fenómenos de incompatibilidad (Gebhardt y Goldbach, 1988)

Buscando una mejor respuesta al ápice meristemático de algunos cítricos, Murashige *et al.* (1972) y Navarro *et al.* (1975) plantearon la posibilidad del microinjerto *in vitro* de ápices sobre plántulas provenientes de semillas, logrando así el desarrollo de plantas libres de numerosos virus y sin características juveniles (Navarro y Juárez, 1977; Roistacher, 1977).

Introduciendo algunas modificaciones a las técnicas disponibles, fue posible regenerar plantas de durazno libres de virus como Sharka o Plum Pox y algunas cepas del Necrotic Ringspot Virus (NRSV), cuando se microinjertaron *in vitro* ápices del cultivar GF 305. Así mismo, Navarro *et al.* (1982) informaron acerca de la eliminación de virus como el Prunus Swarf Virus (PDV) y el Chlorotic Leaf Spot Virus (CLSV) empleando el microinjerto de distintas variedades de duraznero (Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1991). La utilización de estas modificaciones en rosáceas ha implicado la utilización de diferentes pretratamientos para estimular el desarrollo de ápices; entre ellos se pueden mencionar: colocar los ápices sobre papel filtro humedecido con las soluciones minerales de MS, suplementado con auxinas y citocininas; mejorar la nutrición de los microinjertos al colocar una pieza de agar con BA y zeatina entre el patrón y el injerto (Jonard *et al.*, 1983).

Con respecto a especies maderables, el microinjerto *in vitro* permite aprovechar la estabilidad genética y características morfológicas de los ápices y al mismo tiempo evita los problemas asociados a juvenilidad y al enraizamiento de los tejidos adultos (Bonga, 1982). En *Pinus pinaster*, *Sequoiadendron giganteum*, *Thuja plicata*, *Hevea brasiliensis*, *Persea americana* y *Cedrela odorata*, el microinjerto se ha utilizado para el rejuvenecimiento de meristemas y la posterior aplicación en mejoramiento genético (Ojeda, 1986; Pierik, 1990).

Ojeda (1986) logró microinjertar ápices de *Cedrella odorata*. en patrones de la misma especie con fines de mejoramiento.

Ya sea en asocio o no con tratamientos de calor, el microinjerto ha permitido la eliminación de virus en numerosos cultivares de árboles frutales. Además, esta técnica ha hecho posible una mejor comprensión del mecanismo de la incompatibilidad entre injertos diferentes, un fenómeno que afecta a las plantas injertadas y que causa una disminución muy significativa en la productividad de los árboles combinado con la aparición frecuente de irregularidades fisiológicas (Herrero, 1951).

Hasta la fecha no se ha intentado la microinjertación de ápices meristemáticos de *Pouteria sapota*, este procedimiento permitirá un mayor conocimiento de métodos de propagación para esta especie.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Macropropagación (injertación y enraizamiento de estacas).

3.1.1 Localización del estudio

Los trabajos experimentales se llevaron a cabo en el invernadero, así como directamente en el campo de la Unidad de Recursos Fitogenéticos del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) ubicado en Cabiria, Turrialba, Costa Rica.

3.1.2. Condiciones físicas de cultivo.

El área experimental está ubicada geográficamente a 9°53' de Latitud N, y 83°39' de Longitud E. La altitud es de 602 msnm, con una temperatura promedio anual de 22.3°C, y con una precipitación anual de 2600 msnm. Los meses de enero, febrero y marzo presentan los menores índices de precipitación; la humedad relativa del aire es del 90%. De acuerdo con la clasificación de vida de Holdridge (1987), la zona corresponde al tipo "Bosque Húmedo Premontano".

3.1.3. Material Vegetal

3.1.3.1. Material Vegetal para las pruebas de Injertación

3.1.3.1.1. Obtención de patrones

Se utilizó como patrón plantas de tres meses de edad de *Pouteria sapota*, genotipo 10641-1, provenientes de semillas, las cuales fueron sembradas en bolsas de polietileno de 25 x 40 cm.

Para obtener buenos patrones o portainjertos, se seleccionó semillas de árboles con características deseables tales como vigor, estado sanitario, estructura y resistencia a plagas y enfermedades. Una vez obtenida la semilla, después de limpiarse con agua, se colocó en las camas de germinación que consisten en mezcla de arena de río y tierra (50 y 50%). Esta semilla debió ser colocada en la posición correcta para su germinación, la cual consiste en poner el lado más agudo de la misma directamente dentro del sustrato, ya que de lo contrario se afecta el desarrollo del embrión (Umaña, 1997; Morera, 1992). Posteriormente, cuando el epicotilo alcanzó de 3-10 cm de longitud, se transplantaron a bolsas de polietileno, que se colocaron en condiciones de invernadero.

3.1.3.1.2 Obtención de varetas

Se utilizó ramas de último crecimiento (4-6 meses) de árboles adultos de la colección del CATIE, provenientes de tres genotipos de *P. sapota* (G1: 11301-2; G2: 11252-1 y G3: 10641-1.) Para la selección de la vareta se escogió aquellas que presentaban un follaje adulto con ápice cerrado; éstas se prepararon con 10-20 días previo a la injertación, cortando las hojas y dejando solo los pecíolos. Las púas se agruparon considerando diámetros similares al de los patrones.

3.1.3.2 Material vegetal utilizado en el enraizamiento de estacas

Se obtuvo de árboles de la especie *P. sapota* las cuales se recolectaron de la estación experimental Cabiria. Los genotipos, para el primer ensayo de enraizamiento se detallan a continuación: G1: 10800-2; G2: 10641-1; G3: 11252-1; G4: 9767-2; G5: 11168-2; G6: 11301-2.

En el caso del segundo ensayo se utilizaron los mismos genotipos, solo que identificados de la siguiente manera: G1: 9767-2; G2: 11168-2; G3: 11301-2; G4: 10641-1; G5: 11252-1; G6: 10800-2.

3.1.4. Experimentos realizados

3.1.4.1 Injertación del material de zapote

Se realizaron dos tipos de injertos: púa y enchape lateral. En ambos se utilizó como patrón plantas de tres meses de edad de los genotipos mencionados anteriormente. La longitud de los patrones a la hora de efectuar el injerto fue de 40 cm; mientras que para el injerto o vareta se utilizaron ramas de *P. sapota* del último ciclo de crecimiento (de 4 a 6 meses). Los injertos se realizaron sobre el patrón a una altura de 15 cm del suelo. Ambas técnicas de injertación se evaluaron tanto en condiciones ambientales de campo (Fig. 1 a.), así como de invernadero (Fig. 1 b.)

Se efectuó un total de 120 injertos, de los cuales 60 se efectuaron utilizando la técnica de injerto de púa y 60 con la técnica de injerto de enchape lateral.

3.1.4.1.1 Injerto de púa

Se realizaron 60 injertos de púa, de los cuales 30 se colocaron bajo luz directa en el campo y 30 en invernadero. Las púas usadas para la injertación tuvieron un grosor de 0.8-1 cm, una longitud de 10 cm, y un promedio de 15 yemas.

Se seleccionaron extremos terminales jóvenes, con una longitud de 5 a 10 cm, a los cuales se les removió 2/3 de cada hoja. Para injertar, se cortó el patrón de 15 a 20 cm arriba de la línea del suelo y se hizo un corte vertical con una longitud de 2 a 5 cm, partiendo a la mitad el extremo del patrón. En el portainjerto se efectuaron dos cortes de adelgazamiento de igual longitud que dieron una forma de cuña (en forma de V). Seguidamente se puso la cuña del portainjerto dentro del corte vertical del patrón, tratando de favorecer que se produjera la unión de las dos capas de cambium. Posteriormente se enrolló el injerto con la cinta injertadora (Balerdi et al. 1996; Hartmann y Kester, 1990; Umaña, 1997).

3.1.4.1.2 Injerto de enchape lateral

Se realizaron 60 injertos de enchape lateral, de los cuales 30 se colocaron bajo luz directa en el campo y 10 en invernadero.

Para efectuar este tipo de injerto, la primera incisión se hizo al patrón y consistió en introducir la navaja a una profundidad no mayor de 2 mm, deslizándola longitudinalmente y en forma descendente por unos 7 ó 9 cm.

Al completar los 9 cm, se extrajo la navaja y a nivel del último centímetro se volvió a practicar otro corte similar sobre el anterior, provocando la extracción de una parte de la corteza, que a su vez fue la región en la que se depositó la parte inferior de la vareta.

Para evitar contaminación, estas varetas se sumergieron previamente en una solución de Benomil a razón de 2 g por litro durante 10 minutos. La incisión o corte fue en lo posible similar a la que se efectuó sobre el patrón, únicamente que en el extremo basal de la vareta el corte fue oblicuo para permitir el acuíñamiento de los dos cambium.

Una vez que se tuvo listo el corte de la vareta se procedió a retirar la sección de la cortezas y seguidamente a promover el acercamiento de ambas partes (vareta-patrón). Se logró estabilidad en la fricción de los tejidos amarrando fuertemente con cinta plástica de injertar; asegurando de este modo que la unión fuera perfecta. Posteriormente se protegió con parafina para evitar la entrada de agua.

Después y bajo diferentes períodos se procedió a cortar la parte apical del patrón con el objeto de inhibir el crecimiento del mismo y estimular el desarrollo lateral de la planta.

El riego fue aplicado de manera controlada tratando de no provocar entradas de agua en la unión del injerto. Se continuó con el programa de aplicación química tanto al suelo como al follaje (Anexo 4).



Fig. 1 a. Injertos en condiciones de campo. CATIE, 1998.



Fig. 1 b. Injertos en condiciones de invernadero. CATIE, 1998.

3.1.4.2. Propagación por estacas.

Se efectuaron pruebas preliminares para determinar un diámetro de estacas que produjera los mejores resultados, para lo cual se evaluó el enraizamiento de estacas adultas de *Pouteria sapota*, bajo condiciones de invernadero.

Se colectaron ramas del último ciclo de crecimiento, tratando de que fueran lo más uniformes posibles en cuanto a tamaño, grosor y número de nudos.

Las estacas midieron 12-15 cm de longitud en promedio y de 14-17 mm de diámetro en promedio; estaban provistas de 2-3 hojas cortadas hasta la mitad de su longitud para evitar una transpiración excesiva de la planta, lo cual se detalla en la Fig. 2.

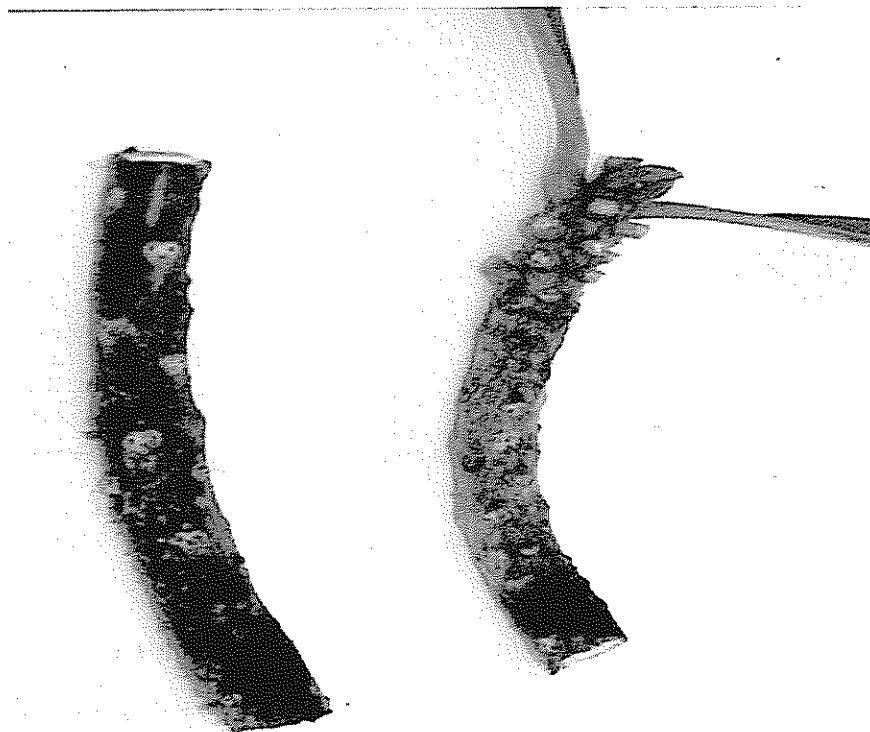


Fig. 2 Estacas adultas de *Pouteria sapota*, utilizadas para la técnica de enraizamiento. CATIE, 1998.

Se probaron tres tipos diferentes de sustratos (arena, tierra y una mezcla en igual proporciones de arena y tierra), con tres diferentes concentraciones de AIB (ácido indole butírico) (0,4, 0,8 y 1,2 %) y dos tipos de posición de estacas (región basal y apical).

De acuerdo a los resultados encontrados en este ensayo, se decidió establecer otro experimento con estacas provenientes de brotes rejuvenecidos de diferentes genotipos de árboles de *Pouteria sapota* (Fig. 3) que se encuentran en el campo experimental Cabiria, para lo cual se decidió seguir dos tipos de ensayos.



Fig. 3 Brotes rejuvenecidos de *Pouteria sapota*. CATIE, 1998.

En ambos ensayos se utilizó un propagador de subirrigación (Anexo 5), el cual es básicamente una caja rodeada de plástico transparente que retiene el agua (con un marco de madera) dentro de la cual se saturan con agua las capas de piedras y grava, encima de las cuales se coloca el sustrato para enraizamiento. El agua proporciona los requerimientos de humedad para las estacas, siempre y cuando el propagador permanezca cerrado. Al abrirlo ocurre una rápida reducción de la humedad, por lo que es importante minimizar este efecto

mediante aspersiones periódicas con alguna fuente de agua. Se debe tener cuidado de mantener el plástico limpio y libre de agujeros, ya que la suciedad reduce la cantidad de luz que llega a las estacas y puede limitar el enraizamiento (Leakey y Mesén, 1993).

Estos propagadores son particularmente útiles para áreas rurales, siendo contruidos de materiales fácilmente disponibles y sin requerimientos de fuentes eléctricas o sofisticados sistemas de aspersión (Leakey *et al.*, 1990). Las condiciones ambientales promedio dentro de los propagadores se detallan en el Anexo 6.

Se seleccionaron estacas de 40 a 50 cm de longitud, las cuales fueron recolectadas en horas tempranas del día, y trasladadas al área de propagación. El entrenudo superior de cada rebrote fue descartado y en los demás entrenudos se eliminaron las hojas y se dejó solamente una de éstas con un tercio de su superficie foliar aproximadamente (Fig. 4).

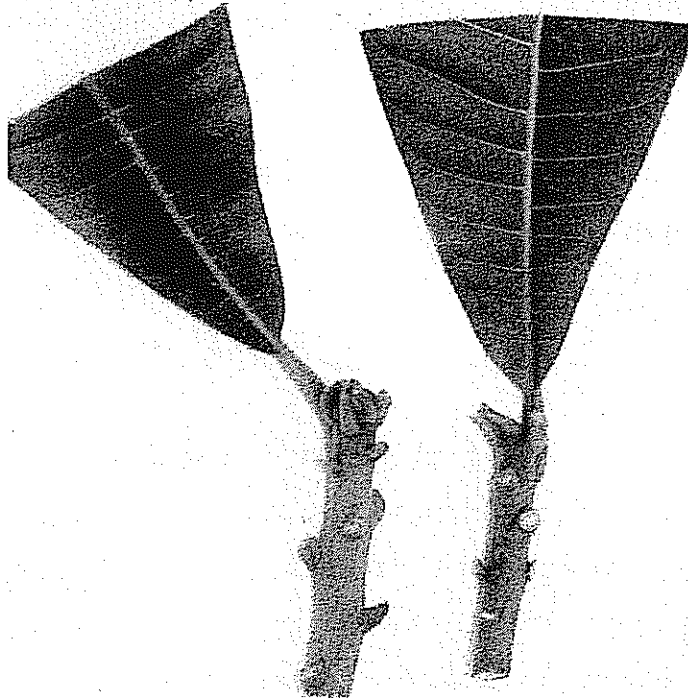


Fig. 4 Estacas rejuvenecidas *Pouteria sapota*. CATIE, 1998.

Debido a la escasa disponibilidad de material vegetal, se utilizaron 184 estacas para el primer ensayo, distribuidas de la siguiente manera:

G1: 43 estacas

G2: 55 “

G3: 19 “

G4: 20 “

G5: 16 “

G6: 32 “

Para el segundo ensayo se utilizaron un total de 194 estacas distribuidas así:

G1: 33 estacas

G2: 11 “

G3: 60 “

G4: 45 “

G5: 26 “

G6: 19 “

Se evaluaron dos sustratos para enraizamiento: arena y aserrín. Las estacas del primer ensayo se sometieron a un estimulador de enraizamiento comercial, Seradix, con una concentración de 0.3 % p/p de AIB (ácido α -indole 3-butírico) en talco, introduciendo directamente la base de la estaca dentro del Seradix.

En un segundo ensayo bajo las mismas condiciones, se utilizó una concentración de 1.2% de AIB. Para la aplicación de la concentración de AIB mayor que la del enraizador comercial, la estaca se colocó en contacto directo con el enraizador (AIB) diluido en etanol al 100%; luego, se secó el alcohol en una corriente de aire (Mesén, comunicación personal, 1997) Una vez que fueron sometidas al estimulador del crecimiento las estacas fueron colocadas verticalmente hasta la mitad de su longitud en hoyos de 2-3 mm de profundidad en los dos diferentes medios de enraizamiento (Fig. 5).

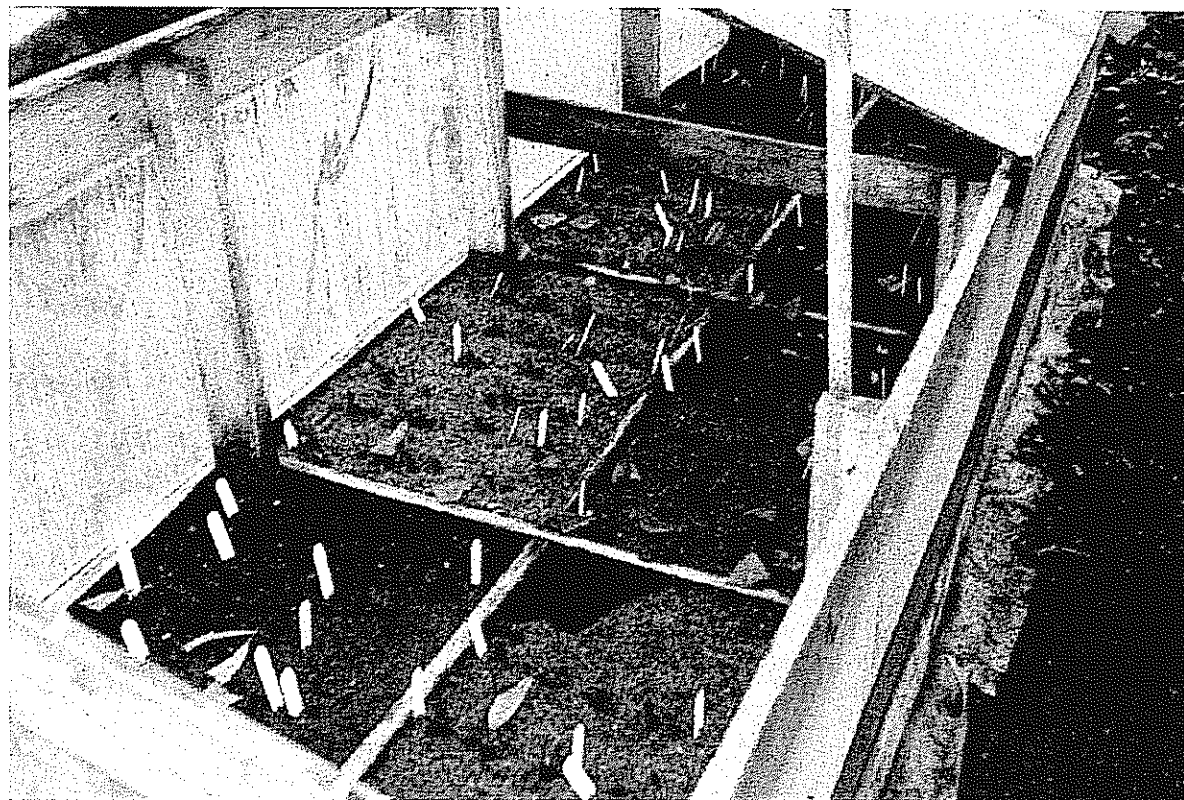


Fig. 5 Estacas colocadas en el propagador de subirrigación en los dos medios de enraizamiento, arena y aserrín. CATIE, 1998.

3.2 Micropropagación (cultivo de ápices y microinjertos).

3.2.1 Localización del estudio

Los trabajos de micropropagación se realizaron en el laboratorio de Cultivo de Tejidos del CATIE.

3.2.2 Condiciones físicas de cultivo

Todos los cultivos se colocaron en cuartos de crecimiento bajo un fotoperíodo de 12 horas, con intensidades lumínicas de 2000 lux. La temperatura del cuarto de crecimiento fue de aproximadamente $27\pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.2.3 Material vegetal utilizado en el cultivo *in vitro*

Para el cultivo de ápices y la preparación del ápice injerto se utilizó plantas provenientes de semillas de diferentes genotipos (Fig. 6a. y 6b.), las cuales fueron sembradas en bolsas de polietileno negras de 25 x 40 cm, colocadas en el invernadero. Dichas plantas fueron fertilizadas cada semana con Wuxal (1.5ml.l^{-1}); también se efectuaron aplicaciones de agrymicin 100 (2.2 g.l^{-1}); benlate (2g.l^{-1}) y tamarón (1.55ml.l^{-1}).

Los portainjertos se prepararon a partir de semillas de diferentes genotipos colectadas en la estación experimental Cabiria y en Orotina de Alajuela, Costa Rica.



Fig. 6 a. Plantas madre de *Pouteria sapota* en el invernadero, fuente de explantes para el cultivo *in vitro* de ápices.



Fig. 6 b. Plántula de *Pouteria sapota* de donde se tomaron los ápices. CATIE, 1998.

3.2.4. Cultivo de ápices

3.2.4.1 Desinfección de los explantes.

Debido a problemas de limitación de material de *Pouteria sapota* se realizó pruebas preliminares de desinfección con materiales de *Pouteria viridis*.

Como explante se utilizó ápices de aproximadamente 7-8 mm, constituidos del meristemo terminal y una sección de tallo de 5 mm.

En todos los experimentos de desinfección los explantes fueron lavados con agua y jabón con la ayuda de un algodón. Se estudió el efecto de la aplicación de diferentes agentes desinfectantes sobre la contaminación del explante inicial. Para tal efecto se utilizó diferentes tratamientos con hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio. En algunos casos se utilizó benlate (Benomyl) para tratar de reducir la infección por hongos. Además se evaluó el efecto del ácido cítrico (150 mg.l^{-1}) y carbón activado (1 g.l^{-1}) como posibles agentes antioxidantes.

Los tratamientos de desinfección utilizados son mostrados en los cuadros de resultados (6, 7, 8, 9 y 10).

3.2.5 Microinjertos

3.2.5.1 Preparación del portainjerto

Las semillas utilizadas para obtener el portainjerto, fueron lavadas con agua y jabón, y desinfectadas con una solución de hipoclorito de calcio al 10% durante 20 minutos, seguido de tres enjuagues con con agua destilada estéril. El eje embrionario se extrajo por rompimiento de la cubierta seminal y se sembró conservando parte de los cotiledones. Como recipiente de cultivo se utilizó frascos "gerber" conteniendo 30 ml de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962; (Anexo 7), suplementado con sacarosa al 3%. Los medios se esterilizaron en

autoclave a 121°C (1,05 kg de presión cm⁻²) durante 20 minutos. La desinfección de las semillas se hizo bajo condiciones estériles en una campana de flujo laminar. Como portainjerto se utilizó plántulas con epicotilos rectos y con el sistema radicular bien desarrollado (Aguilar, 1990).

3.2.5.2 Preparación del ápice-injerto

El injerto consistió de un ápice de aproximadamente 5 mm, constituido del meristemo y tres primordios foliares. Estos ápices fueron desinfectados con el tratamiento E4 mostrado en el Cuadro 8 (Ojeda, 1986).

3.2.5.3. Procedimiento para el microinjerto

Se efectuaron pruebas preliminares utilizando dos técnicas de microinjertación con el fin de determinar aquella que proporcionara los mejores resultados, las técnicas que se evaluaron fueron la de enchape lateral y púa.

En ensayos posteriores se procedió a trabajar con la técnica de enchape lateral.

Como portainjerto se utilizó plántulas de dos meses de edad. Estas plántulas fueron cortadas a nivel del epicotilo donde se realizó una incisión longitudinal de aproximadamente 0,5 cm para permitir la inserción del ápice injerto.

El ápice injerto fue preparado antes de la injertación mediante un corte en bisel a ambos lados de su eje y se acopló al portainjerto mediante una unión lateral tipo hendidura (Ojeda, 1986) y como soporte de la unión del microinjerto se utilizaron cintas de papel aluminio estéril (Fig. 8)(Aguilar, 1990).

Los microinjertos se cultivaron en medio básico MS semisólido, en tubos de ensayo de 2,5 x 15,0 cm, con un volumen de 15 ml de medio. Posteriormente, las plántulas fueron colocadas en las cámaras de crecimiento bajo las condiciones físicas referidas anteriormente.

3.3 Estudio histológico

Para este estudio se realizaron secciones transversales y longitudinales de microinjertos así como de estacas.

En el caso de las estacas, se colectaron muestras de campo del genotipo que mejores resultados proporcionó en el enraizamiento y de aquel en el que hubo una menor respuesta. Así mismo, se realizaron cortes transversales a las estacas enraizadas con el fin de determinar el origen de dichas raíces. Además, se realizaron cortes histológicos a los microinjertos, con el fin de observar las respuestas tanto del patrón como del ápice-injerto.

Todas estas muestras fueron fijadas en una solución FAA (etanol al 95%, agua destilada, formalina y ácido acético, en relación 10:7:2:1, respectivamente), seguido de una deshidratación en una serie ascendente de etanol (50 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100% y 100%). Finalmente se colocaron en medio de inclusión y al día siguiente se depositaron en moldes para la infiltración de resina (Anexo 8).

Se realizaron cortes a 4µm de grosor, utilizando para esto un microtomo de rotación. Los cortes fueron fijados a la lámina y luego se tiñeron utilizando la técnica de Schiff-Naphtol-Blue Black. La interpretación y toma de fotografías se llevó a cabo con un microscopio Nikon microphot-FX.

3.4 Modelo estadístico

El análisis estadístico consistió principalmente en un análisis de varianza, comparación de medias por el criterio Tukey y diferencia mínima significativa, utilizando el procedimiento

GLM de SAS. Las especificaciones de los diferentes análisis utilizados en los ensayos se detallan en el Anexo 9.

3.4.1 Variables analizadas para la macropropagación

3.4.1.1 Injertación

- Porcentaje de prendimiento de los injertos : la medición para esta variable se efectuó al final del experimento.
- Sobrevivencia de los injertos: esta variable se evaluó a lo largo de todo el ensayo.
- Desarrollo de los injertos (longitud): Se efectuaron cuatro tomas de datos de esta variable: la primera fue efectuada a la quinta semana de montado el ensayo, la segunda a la séptima semana; la tercera a la novena semana y la última correspondiente a la onceava semana, que coincidió con la finalización de la evaluación del experimento.
- Sobrevivencia de los injertos: Fue evaluada a través del tiempo que duró el ensayo.

3.4.1.2 Enraizamiento de estacas

- Porcentaje de enraizamiento de las estacas (relacionado con tipos de sustratos, concentraciones de AIB y genotipos utilizados).
- Turgencia y viabilidad de las estacas: dependiendo de la presencia de látex en brotes terminales para el caso de las estacas que provienen de la parte apical y permanencia de látex y hojas en estacas de la parte basal. Esta variable fue evaluada a través del tiempo que duró el experimento.
- Presencia de callo: Esta variable fue medida a lo largo del ensayo

- Desarrollo de brotes; Las mediciones para esta variable se realizaron a lo largo de la duración de los ensayos.

3.4.2 Variables analizadas para la micropropagación

3.4.2.1 Cultivo de ápices

- Porcentaje de ápices sanos: que no presenten contaminación (hongos o bacterias)
- Porcentaje de ápices contaminados con hongos y con bacterias.
- Porcentaje de ápices que no presenten oxidación .

Las tres variable antes mencionadas fueron evaluadas durante dos semanas.

3.4.2.2 Microinjertos

No se pudo efectuar una medición de las variables para el caso del ensayo de microinjertos, ya que todos los microinjertos efectuados murieron a las dos semanas de haber iniciado el experimento.

3.4.3 Unidades experimentales

La unidad experimental para los diferentes ensayos de injertación, enraizamiento de estacas, cultivo de ápices y microinjertación se detalla a continuación:

Injertación: cada unidad experimental estuvo constituida por una planta injertada sembrada en la bolsa de polietileno negra.

Enraizamiento de estacas: estuvo consituido por cada una de las estacas que fueron sembradas en el propagador de subirrigación en cada uno de los sustratos evaluados.

Cultivo de Ápices: cada uno de los ápices sembrados en los tubos viales.

Microinjertos: cada uno de los microinjertos sembrados en los tubos de ensayo.

4. RESULTADOS

4.1 Macropropagación de la especie.

4.1.1 Ensayo de injertación

Los análisis de varianza para las variables longitud del injerto, sobrevivencia y prendimiento, así como porcentaje de prendimiento se detalla en los Cuadros 2 y 3.

Cuadro 2 Análisis de varianza para las variables longitud, prendimiento y sobrevivencia para los injertos de *Pouteria sapota*. CATIE, 1998.

FV	CUADRADOS MEDIOS Y PROBABILIDADES									
	gl	LONGITUD		P	gl	PRENDI		P	SOBREV	P
INJERTO	1	25,6	NS		1	12,219	0,0005**		8,353	0,0037**
CONDICIÓN	1	79,187	0,0238*		1	0,0007	NS		3,819	0,0475*
INJ.*GEN.	2	12,923	NS		2	3,378	0,0301*		1,747	NS
INJ.*COND.	1	7,645	NS		1	2,637	NS		4,492	0,0318*
SEMANA	3	61,987	0,0001**		10	2,705	0,0001**		6,789	0,0001**
INJ.*SEMANA	3	0,643	NS		10	0,452	0,0001**		0,554	0,0001**
GEN.*SEM.	3	0,739	NS		20	0,213	0,0004**		0,129	0,0290*
COND.*SEM.	3	2,188	NS		10	0,471	0,0001**		0,117	NS
INJ.*GEN.*SEM.	6	0,744	NS		10	0,289	0,0001**		0,214	0,0001**
INJ.*COND.*SEM.	3	0,172	NS		20	0,164	0,0458*		0,227	0,0011**
GEN.*COND.*SEM.	6	1,972	0,0322*		20	0,167	0,0096**		0,103	NS

*significancia del 5%; **significancia del 1%

Cuadro 3 Análisis de varianza para la variable porcentaje de prendimiento para los injertos de *Pouteria sapota*, CATIE, 1998.

FV	CUADRADOS MEDIOS Y PROBABILIDADES		
	gl	porcentaje de prendimiento	P
INJERTO	1	1875	0,0377*
CONDICIÓN	1	675	NS
INJERTO*GENOTIPO	2	675	NS
INJERTO*CONDICIÓN	1	675	NS

*significancia del 5%

A continuación se analizarán los factores que resultaron significativos al 1-5% para las diferentes variables en estudio:

4.1.1.1 Desarrollo del injerto (longitud)

Los análisis estadísticos revelaron diferencias significativas para las condiciones ambientales evaluadas y la interacción entre el genotipo, la condición y la semana. Además se observaron diferencias en el comportamiento de los injertos a través del tiempo. El resto de los factores evaluados no mostraron diferencias entre los diferentes tratamientos (Cuadro 2).

Las Figs.7 y 8 muestran el comportamiento de los genotipos tanto en las condiciones de campo como de invernadero.

En la Fig. 7 se observa que para la última semana de evaluación, en el campo, el genotipo 3 (10641-1) se diferenció de los demás (Anexo 10), ya que presentó el mejor desarrollo. Los genotipos 1(11301-2) y 2(11252-1) respondieron en menor grado a las condiciones soleadas, sin embargo no se observaron diferencias estadísticas entre estos dos últimos materiales (Anexo 10).

En la Fig. 8 se observa el comportamiento de los injertos en condiciones de invernadero, y puede apreciarse que el genotipo 1(11301-2) fue el que mostró mayor reactividad durante las primeras 9 semanas de evaluación; no obstante, a partir de esta fecha muestra una tendencia hacia un desarrollo constante. A diferencia de este genotipo, los genotipos 2 (11252-1) y 3(10641-1) reaccionaron lentamente durante las primeras nueve semanas, caracterizándose por permanecer con el ápice cerrado y sin elongación. A partir de la novena semana, la situación cambió, el ápice empezó a abrirse, permitiendo el desarrollo de los primordios foliares (Fig. 9 a.) y además empezó un alargamiento del mismo (Fig. 9b.).

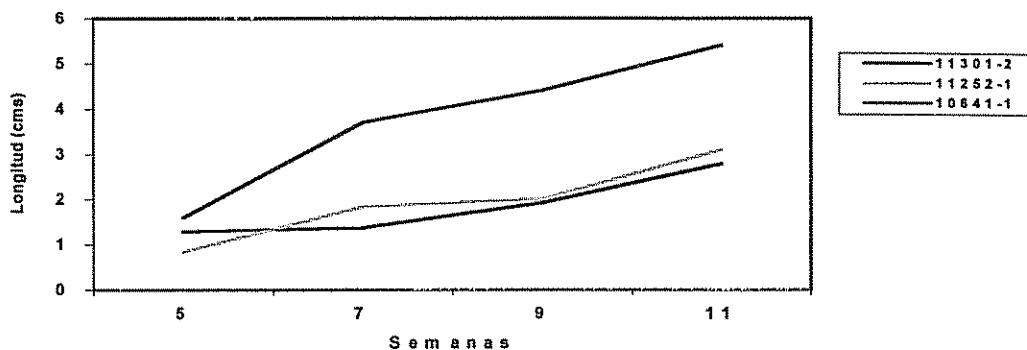


Fig. 7 Longitud promedio de los injertos para los genotipos evaluados en condiciones de campo a través del tiempo.

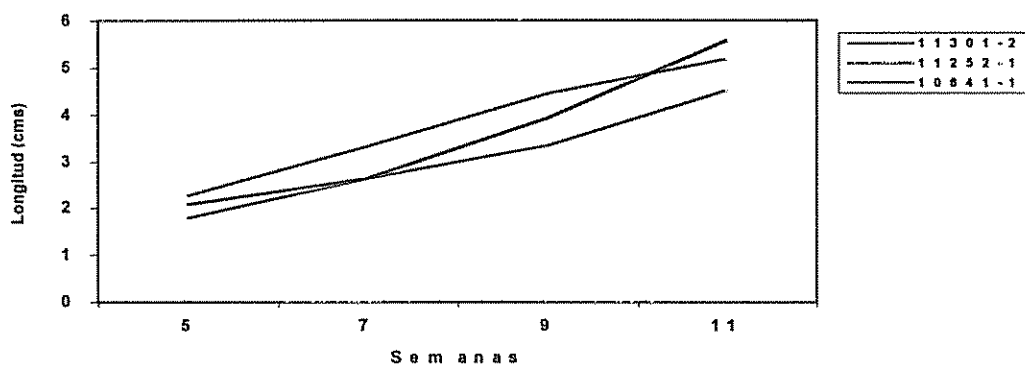


Fig. 8 Longitud promedio de los injertos para los genotipos evaluados en las condiciones de invernadero a través del tiempo.

4.1.1.2. Supervivencia de los injertos

Los análisis estadísticos para esta variable (Cuadro 2) revelaron diferencias significativas para el comportamiento de los factores injerto, semanas, injertos por semana y de injertos por condiciones a través del tiempo, además para las condiciones evaluadas y de injertos por condiciones.



Fig. 9 a. Desarrollo inicial de *Pouteria sapota*, utilizando la técnica de injerto de corona. CATIE, 1998.



Fig. 9 b. Alargamiento y desarrollo foliar del injerto de *Pouteria sapota*, utilizando la técnica de injerto de corona. CATIE, 1998.

En las Figs.10 y 11 se observa el comportamiento de los genotipos 1(11301-2), 2(11252-1) y 3 (10641-1) utilizando la técnica de injerto de corona y de enchape lateral respectivamente, a través del tiempo; en ambas se observa una tendencia a una disminución en el número de plantas vivas de zapote conforme avanza el experimento.

Así mismo, la Fig. 10 muestra que el injerto de corona en el genotipo 2 presenta una mayor viabilidad que los genotipos 1 y 3, los cuales no difieren estadísticamente entre sí (Anexo 11).

Por el contrario en la Fig. 11 observamos que la sobrevivencia en los genotipo 1 y 3 difiere de la media del genotipo 2, pero no difieren entre ellas (Anexo 11).

Comparando ambos gráficos, se observa que el injerto de enchape lateral presentó los mayores porcentajes de sobrevivencia para los genotipos 1 y 3. El genotipo 2 presentó menor porcentaje numéricamente, pero al establecer diferencias de medias no existieron diferencias significativas para ambos tipos de injertos (Anexo 11).

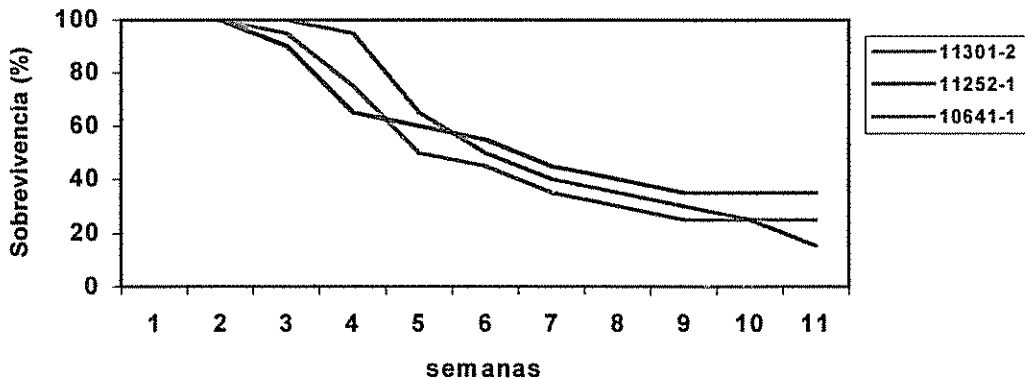


Fig. 10 Sobrevivencia de injertos de zapote para los genotipos evaluados utilizando la técnica de injerto de corona a través del tiempo.

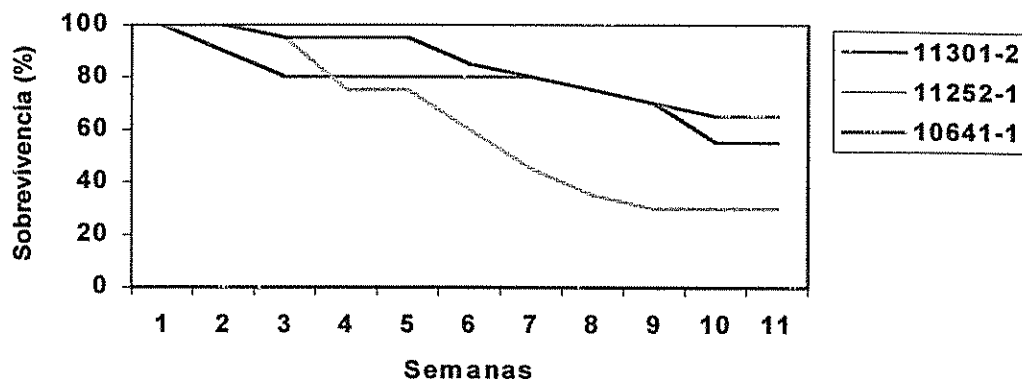


Fig. 11 Sobrevivencia de injertos de zapote para los genotipos evaluados utilizando la técnica de injerto de enchape lateral a través del tiempo.

A su vez, en la Fig. 12 se observa una mayor sobrevivencia de los injertos de corona colocados en condiciones de invernadero, presentándose diferencias estadísticamente significativas para ambos tipos de condiciones (Anexo 12), siendo mayor el promedio en condiciones de invernadero.

Los injertos de corona creciendo en condiciones de invernadero o campo no presentaron diferencias significativas, lo cual se observa en la Fig. 13.

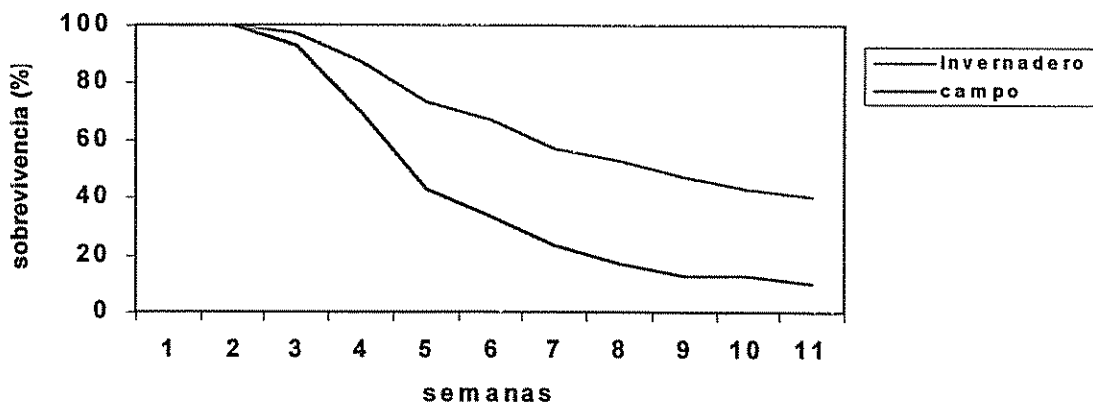


Fig. 12 Sobrevivencia de injertos de zapote para las condiciones de invernadero y de campo, utilizando la técnica de injerto de corona a través del tiempo.

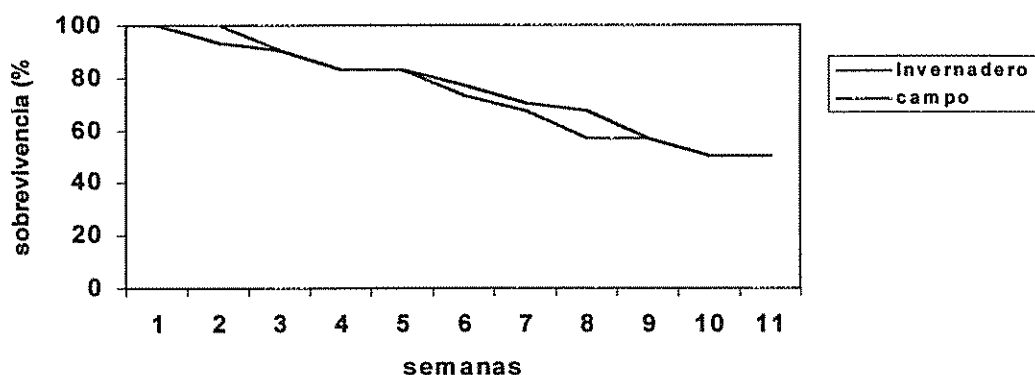


Fig. 13 Sobrevivencia de injertos de zapote para las condiciones de invernadero y de campo, utilizando la técnica de injerto de enchape lateral a través del tiempo.

En general, los valores promedio de sobrevivencia fueron mayores para los injertos de enchape lateral, que crecieron en condiciones controladas de invernadero. Para las condiciones de campo, aunque numéricamente el injerto de enchape lateral presenta una media mayor, estadísticamente no se presentaron diferencias significativas entre las técnicas utilizadas (Anexo 12).

4.1.1.3 Porcentaje de prendimiento

Los resultados del análisis de varianza (Cuadro 3) indican que sólo existen diferencias significativas en el tipo de injerto utilizado. Al llevar a cabo las pruebas de rangos múltiples de Tukey (Anexo 13) se observa que el mejor tipo de injerto es el de enchape lateral (50% de prendimiento) en comparación al de corona (25% de prendimiento). Lo anterior se aprecia en la Fig. 14.

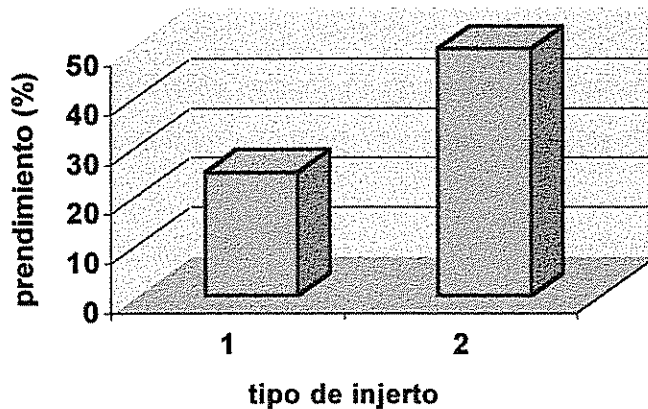


Fig. 14 Porcentaje de prendimiento para los injertos de zapote utilizando injerto de corona(1) y enchape lateral(2).

4.2 Enraizamiento de estacas

Las pruebas preliminares tratando de encontrar un tipo de estaca adecuado mostraron que estacas leñosas de 12-15 cm de largo y 14-17 mm de ancho, provenientes del último ciclo de crecimiento, no tuvieron la capacidad para enraizar. Estas sólo formaron estructuras globulares (denominadas callos) en la base de las estacas, o bien lateralmente, pero la raíz nunca emergió (Fig. 15).



Fig. 15 Formación de estructuras globulares (callos) de estacas adultas de *Pouteria sapota*. CATIE, 1998.

4.1.2.1 Primer ensayo de enraizamiento con brotes rejuvenecidos

Un segundo intento por definir un tamaño y edad de estacas adecuado, permitió establecer que los brotes rejuvenecidos, aunque mantuvieron una buena condición a través del tiempo en algunos genotipos, tampoco originaron raíz (con excepción de 1 estaca).

Los análisis de varianza realizados para las variables turgencia, callo, presencia de hojas y brote dieciséis semanas después del establecimiento de las estacas son presentados en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Análisis de varianza para las variables turgencia, callo, presencia de hojas y brotes para *Pouteria sapota*. CATIE, 1998.

FV	CUADRADOS MEDIOS Y PROBABILIDADES				
	gl	Turgencia	P	Callo	P
SUBSTRATO	1	6,097	0,0151**	1,578	NS
GENOTIPO	5	16,377	0,0001**	6,627	0,0061**
SUBSTRATO*GENOTIPO	5	1,211	NS	1,794	0,0001**
SEMANA	7	5,283	0,0001**	2,347	0,0001**
SUBSTRATO*SEMANA	7	0,067	NS	0,293	0,0001**
GENOTIPO*SEMANA	35	0,264	0,0001**	0,702	0,0001**
SUBS*GENO*SEMANA	35	0,132	0,0012**	0,080	NS

**significancia 1%, *significancia al 5%.

CONTINUACION. . .

FV	CUADRADOS MEDIOS Y PROBABILIDADES				
	gl	Hojas	P	Brote	P
SUBSTRATO	1	0,268	NS	0,675	NS
GENOTIPO	5	20,196	0,0001**	1,307	0,0080**
SUBS*GENO	5	1,548	0,0001**	2,037	0,0003**
SEMANA	7	3,374	0,0001**	0,889	0,0001**
SUBS*SEMANA	7	0,143	0,0319*	0,165	0,0131*
GENO*SEMANA	35	0,174	0,0001**	0,295	0,0001**
SUBS*GENO*SEMANA	35	0,059	NS	0,148	0,0001**

**significancia 1%, *significancia al 5%.

Dichos resultados indicaron que las variables se comportaron de la siguiente manera:

4.1.2.1.1 Turgencia

Los análisis estadísticos indicaron que los únicos tratamientos en los cuales no se presentaron diferencias significativas fueron la interacción existente entre los sustratos arena y aserrín y los genotipos que se estaban evaluando; y por otro lado, la de los sustratos utilizados a través del tiempo. El resto de los factores resultaron ser significativamente diferentes, como se detalla en el Cuadro 4.

Las Figuras 16 y 17 muestran que la arena fue un mejor sustrato que el aserrín, ya que en este último la mortalidad de las estacas en la mayoría de genotipos fue más acelerada que en el primero.

Es importante destacar que el G1 (10800-2) como se muestra en las Figs. 16 y 17 tuvo una respuesta similar en ambos tipos de sustrato y que al finalizar la toma de datos, 16 semanas después de iniciado el experimento, todavía mantenían un buen porcentaje de viabilidad, 81% para el sustrato aserrín y 86% en el sustrato arena. En el Anexo 14 se puede apreciar que para ambos sustratos las medias del G1 (10800-2) fueron significativamente diferentes a las medias de los otros genotipos.

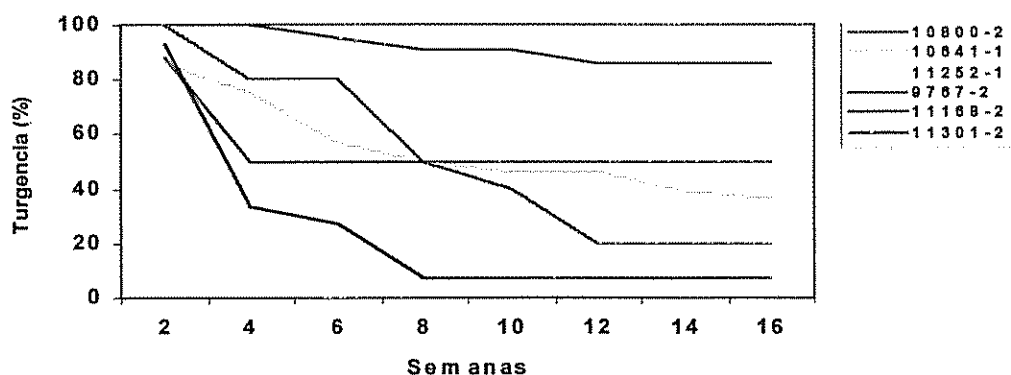


Fig. 16 Turgencia de los genotipos evaluados para el sustrato arena a través del tiempo.

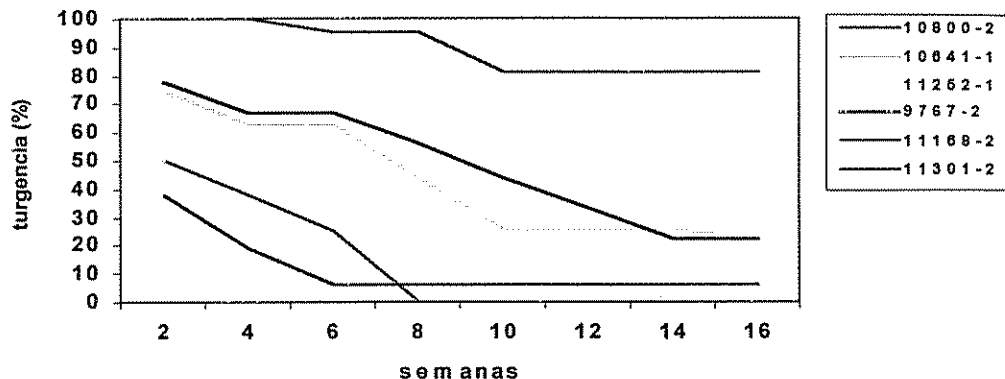


Fig. 17 Turgencia de los genotipos evaluados para el sustrato aserrín a través del tiempo.

4.1.2.1.2 Desarrollo de callo

Se observó que todos los genotipos respondieron con una producción de masas celulares compactas, tanto en la base de la estaca como lateralmente. Dichas masas son denominadas corrientemente como callo (Fig. 18). Esta respuesta se manifestó tanto en el sustrato arena como en el aserrín.

Este callo se caracterizó por ser de consistencia friable, con coloraciones blancas o marfil, con alturas que iban desde unos 1-3 mm, distribuido a lo largo de toda la base del tallo de manera irregular, o emergiendo de la parte central del tallo.

Los análisis estadísticos mostraron que los únicos tratamientos para los cuales no se presentaron diferencias significativas fueron los sustratos utilizados y el comportamiento de los sustratos utilizados por genotipos evaluados a través del tiempo; el resto de tratamientos presentaron diferencias significativas (Cuadro 4).



Fig. 18 Formación de estructuras globulares (callos) de estacas rejuvenecidas de *Pouteria sapota*. CATIE, 1998.

En la Fig. 19 se observan las diferencias entre los sustratos utilizados y los diferentes genotipos. En todos los casos se presentó una mayor producción de callo en las estacas que permanecían en arena; la excepción la constituyen el genotipo 11252-1(G3) y el 9767-2 (G4) en donde la diferencia entre los sustratos arena y aserrín fue igual en cuanto al promedio (Anexo 16). El genotipo 10800-2 (G1) fue el que presentó la mayor media(0.55) seguido por el genotipo 11168-2 (0.43) (G5) (Anexo 15).

También se observa en la Fig. 20 que para la última semana de evaluación el G1 (10800-2) fue el que presentó la mayor producción de callo lo que difirió significativamente de los otros genotipos evaluados. Le sigue en respuesta el genotipo 10641-1 (G2), mientras que la respuesta de los otros genotipos fue bastante baja (Anexo 16).

Al igual que para la turgencia, la producción de los callos a partir de la semana 3 fue siempre mayor para el sustrato arena que para el sustrato aserrín (Fig. 21). Al evaluar las últimas 3 semanas de experimentación se obtuvo diferencias significativas para ambos (Anexo 17).

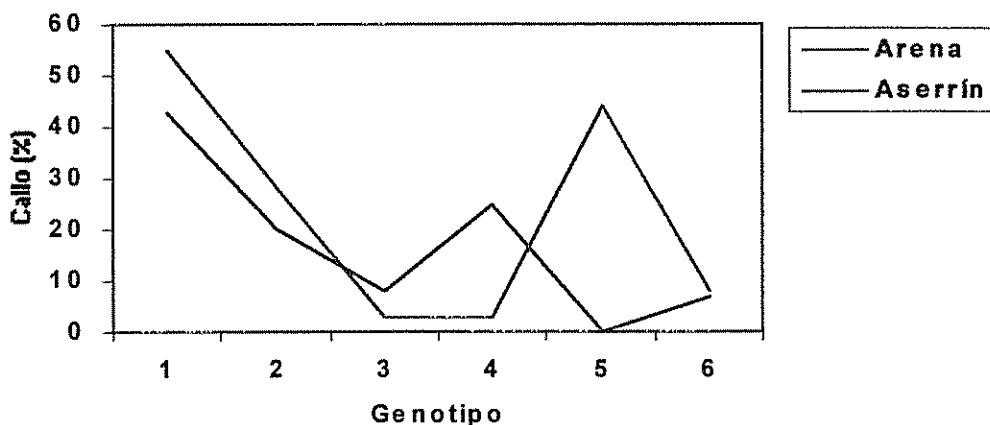


Fig. 19 Desarrollo de callos para los genotipos evaluados en los sustratos aserrín y arena.

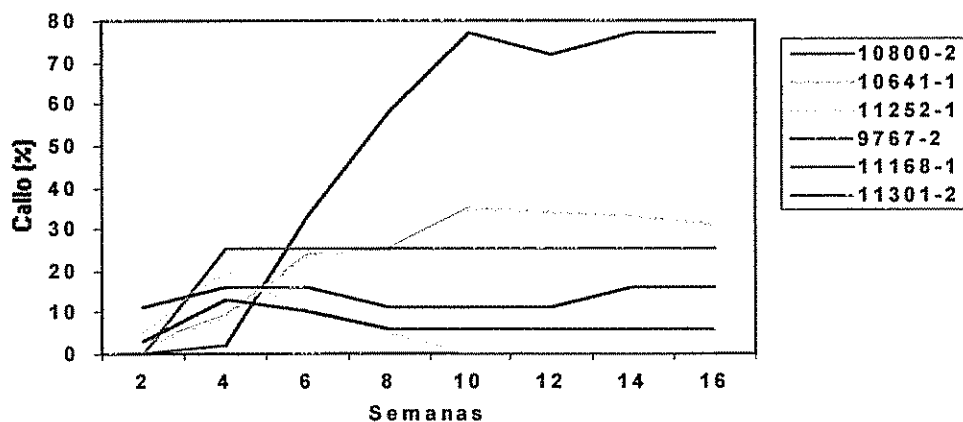


Fig. 20 Desarrollo de callos para los genotipos evaluados a través del tiempo.

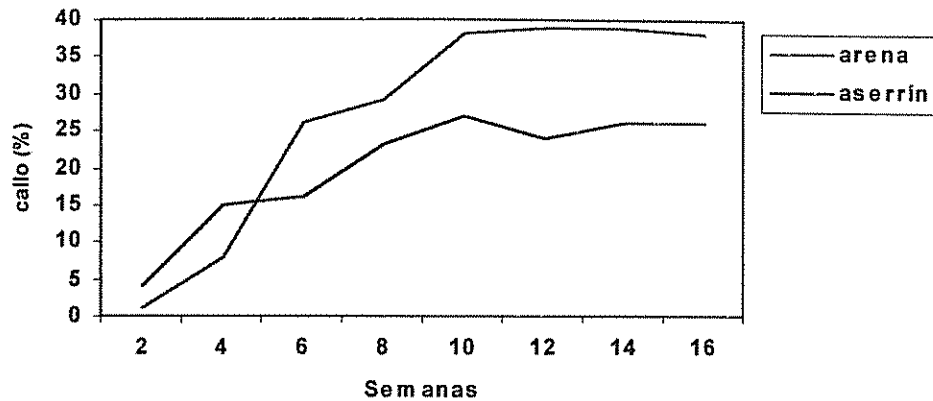


Fig. 21 Desarrollo de callos para los sustratos arena y aserrín a través del tiempo.

4.1.2.1.2.1 Estudios histológicos

Los estudios histológicos efectuados a las estacas de 10800-2 (G1) y 11252-1 (G3), muestran que el primero se caracteriza por tener una corteza con gran cantidad de células parenquimáticas pequeñas. Hacia el interior de ésta se diferencia una capa grande de fibras de paredes muy gruesas que forman un anillo sinuoso y continuo alrededor de todo el tallo (Fig. 22). Se aprecia un floema bien desarrollado con elementos cribosos grandes y pequeñas células compañeras. Interno a él se puede apreciar un anillo continuo de células cambiales; caracterizadas por presentar formas rectangular con divisiones anticlinales y periclinales. A diferencia de lo que se aprecia en otras especies, la zona cambial es una zona muy bien definida (Fig. 23). Hacia el interior del cambium vascular se aprecian los elementos de los vasos grandes formando filas uniseriadas y entre ellas rayos parenquimáticos que con frecuencia se entremezclan con gran cantidad de fibras, de paredes muy gruesas. Muchas de las células que conforman el rayo tienen depósitos de fenoles (Fig. 24).

La médula está compuesta por células parenquimáticas que en su mayoría carecen de algún tipo de contenido en su interior, y al igual que se observa en la corteza, es posible apreciar algunos canales gomíferos (Fig. 25 a.). Tanto la capa de parénquima cortical como la de parénquima medular no están lignificadas.

Es importante mencionar que debido a que esta es una especie con producción de látex, se pensó en la presencia de grandes cantidades de canales laticíferos; no obstante los canales que se aprecian se encuentran rodeados por células epiteliales, por lo que los hemos designado como canales gomíferos.

En el estudio histológico del genotipo 11252-1 (G3) se observa que a diferencia del anterior, presenta un gran número de canales gomíferos en la corteza (Fig. 25b.). En dichos canales se aprecia un precipitado granuloso, que se encuentra presente también en la médula; las células epiteliales que rodean los canales gomíferos son células grandes con núcleo grande. Tal vez producto de la edad, los rayos parenquimáticos no están recubiertos por bandas de esclerénquima. Gran cantidad de dichas células radiales tienen alto contenido de fenolés en su interior. La médula está constituida por células parenquimáticas grandes de espacios intercelulares también grandes. Se aprecia una especie de contenido cristalino en algunas células que conforman la corteza. A nivel de floema se aprecian también células parenquimáticas grandes con contenido granuloso. Las células parenquimáticas de la corteza son más pequeñas y existe un menor número de ellas por unidad de área que la del otro genotipo, ya que hay gran cantidad de canales gomíferos presentes.

Las secciones transversales efectuadas a estacas del genotipo 10800-2 (G1), 16 semanas después de ser colocadas en el sustrato arena, mostraron gran deterioro de los tejidos. Existe taponeamiento, de apariencia cristalina en el interior del elemento conductor y hay daño también a nivel del floema. Dentro de las células parenquimáticas de la corteza y médula se aprecia gran cantidad de micelio y esporas de hongos. Existe daño en la peridermis, observándose un levantamiento de sus células. Las células parenquimáticas del floema se observan colapsadas, con contenido fenólico (Fig. 26).

El callo se forma por una multiplicación acelerada de células parenquimáticas de la corteza. En ellas es posible observar gran cantidad de células con un contenido brillante transparente en su interior (Fig. 27).

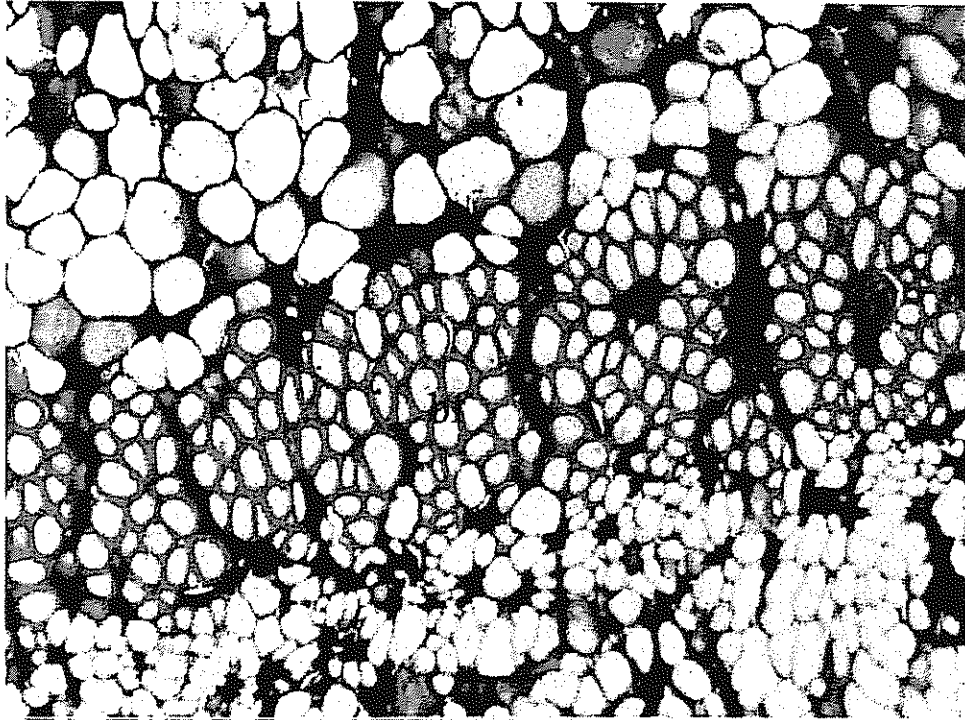


Fig. 22 Corte transversal de tallo donde se observa la banda de fibras protofloicas (bf).
CATIE, 1998.

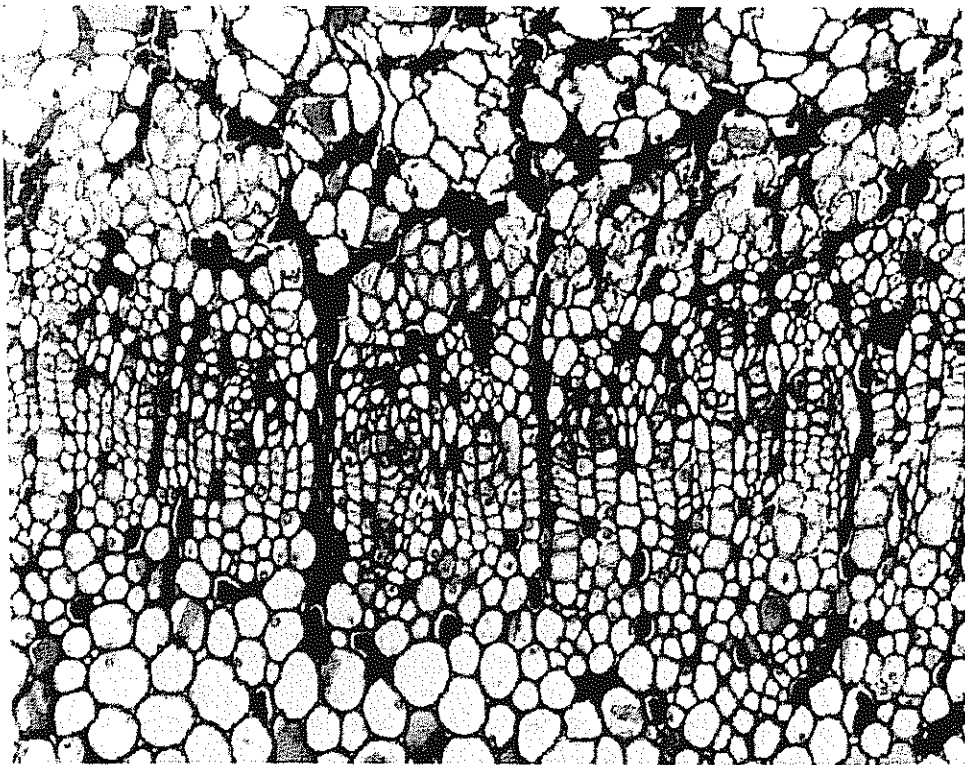


Fig. 23. Sección transversal de tallos de *Pouteria sapota* mostrando cambium vascular.
CATIE, 1998 (cv: cambium vascular).

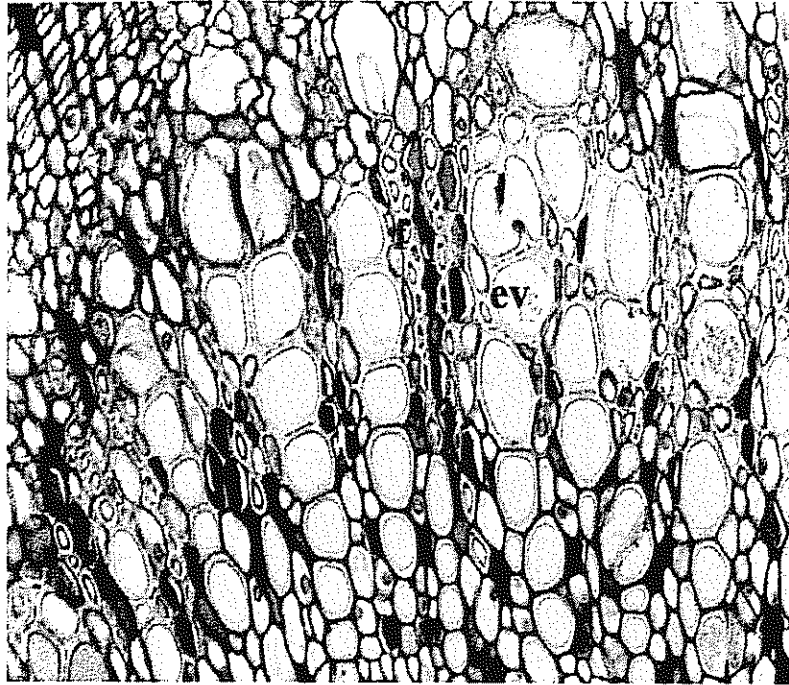


Fig. 24 Sección transversal de tallo donde se observa el área del xilema (ev: elemento de los vasos; r: rayo; f: fibras). CATIE, 1998.

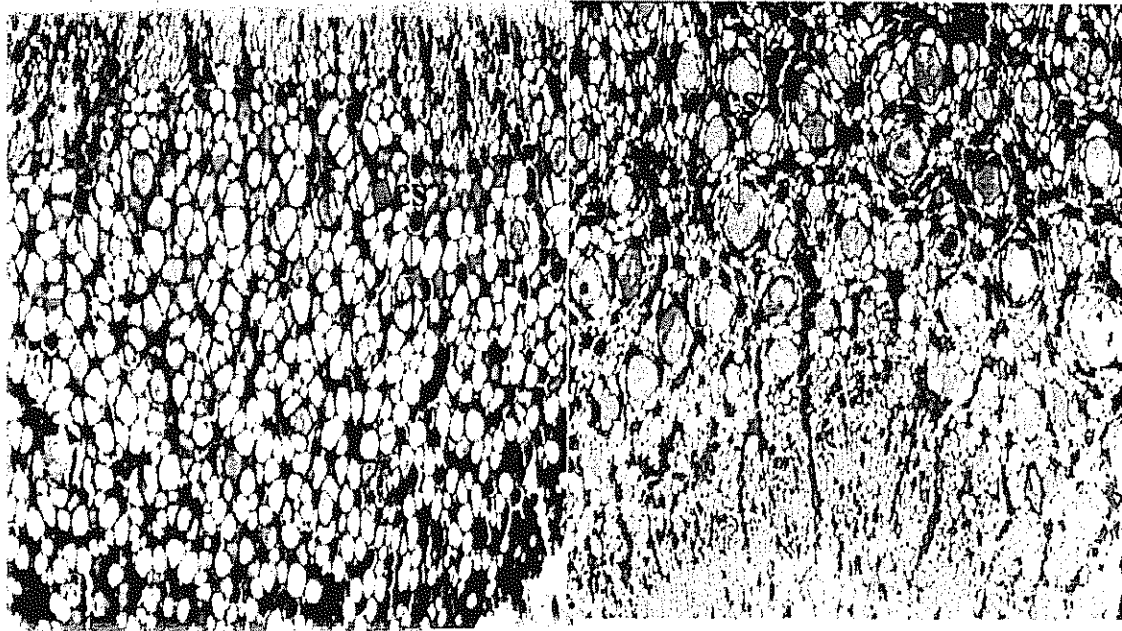


Fig. 25 Sección transversal de tallo que muestra el parénquima cortical. Obsérvese la poca cantidad de canales secretores (cs) en el genotipo 11251-1(a) en comparación de las del genotipo 10800-2 (b). CATIE, 1998.

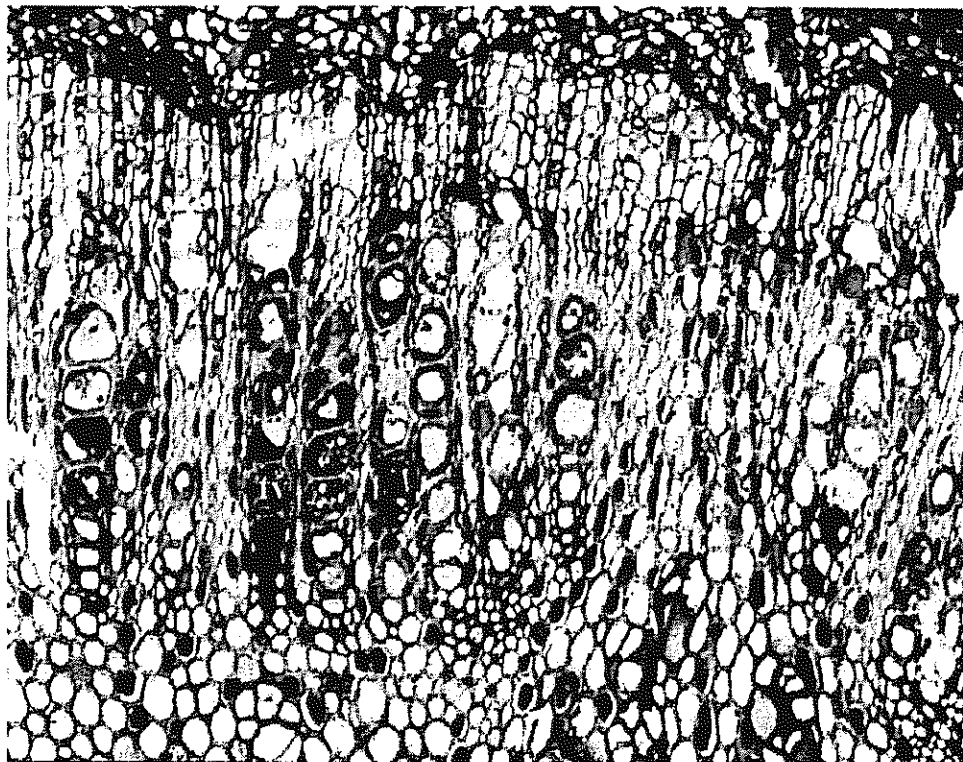


Fig. 26 Sección transversal de estaca después de 16 semanas de iniciada la siembra mostrando taponeamiento de los vasos (tv) y deterioro general de los tejidos. CATIE, 1998.

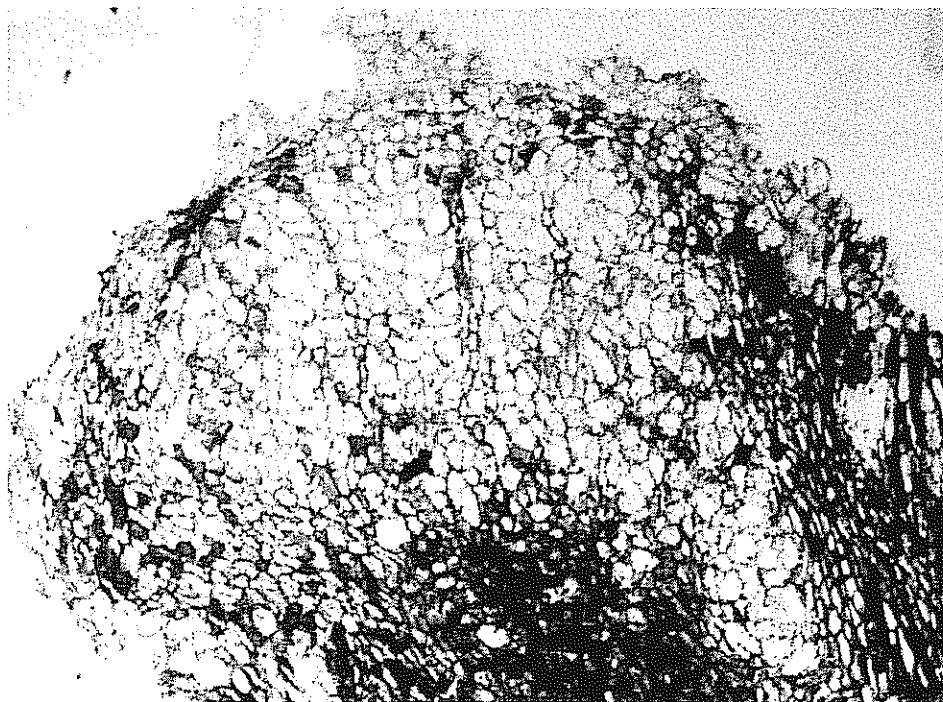


Fig. 27 Sección transversal de estacas donde se muestra la formación de callo en la base de la misma. CATIE, 1998.

4.1.2.1.3 Presencia de hojas

Esta variable presentó diferencias significativas en cuanto a la interacción de los factores genotipo por semana, sustrato por semana, sustrato por genotipo y el comportamiento de la presencia de hojas a través de las semanas (Cuadro 4).

Se observó que el genotipo 10800-2 (G1) fue el que obtuvo la mejor respuesta, ya que las estacas mantuvieron sus hojas a través del tiempo, tanto en el sustrato arena como aserrín, presentándose diferencias entre ambas medias, siendo mayor la media del sustrato arena (Anexo 15). Le sigue en respuesta el genotipo G5 (1168-2) (Fig. 28). El resto de los genotipos presentaron una caída temprana de hojas, la cual aumentó conforme pasó el tiempo. Estos resultados se mantuvieron en ambos tipos de sustratos (Anexo 15).

En la Fig. 29 se observa que para la última semana de evaluación el G1 fue el que presentó el mayor valor medio, el cual difirió significativamente de los promedios de los otros genotipos evaluados, el G5 presentó el segundo mejor promedio, los promedios de los otros genotipos fueron bastante bajos (Anexo 16).

Con respecto a la variación de la presencia de hojas a través del tiempo, a partir de la semana 2 se observa una tendencia a que ambos sustratos se comporten de manera similar (Fig. 30), ya que la diferencia de medias no es significativa en ninguno de los dos (Anexo 18).

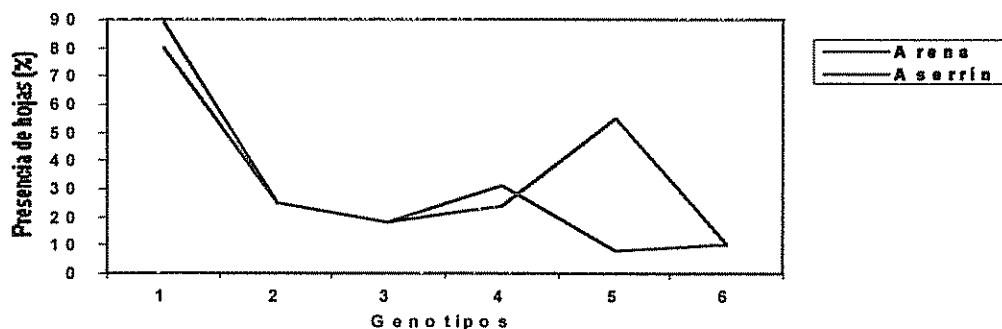


Fig. 28 Presencia de hojas para los genotipos evaluados en los sustratos aserrín y arena.

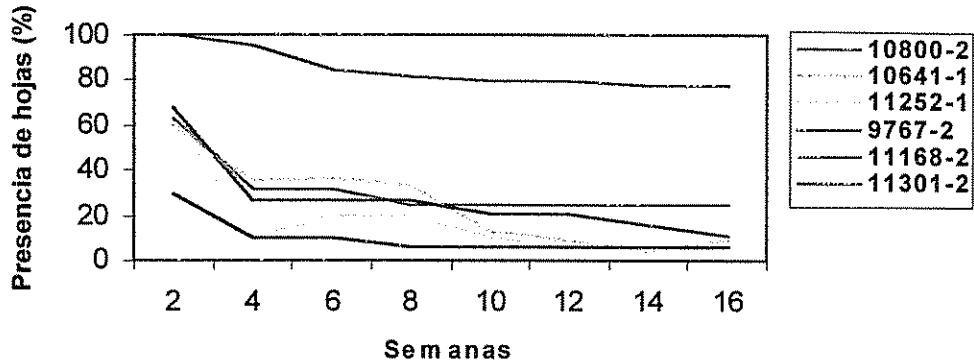


Fig. 29 Presencia de hojas para los genotipos evaluados a través del tiempo.

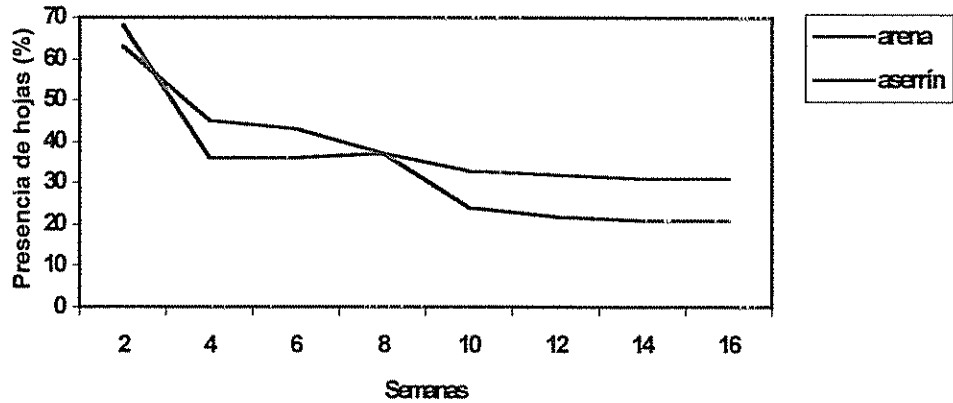


Fig. 30 Presencia de hojas para los sustratos aserrín y arena a través del tiempo.

4.1.2.1.4 Desarrollo de brotes

En el Cuadro 4 se observa que no existieron diferencias significativas en los sustratos utilizados. Para el resto de factores evaluados las diferencias resultaron ser significativamente diferentes en lo que respecta a esta variable.

La Figura 31 muestra que el genotipo 11168-2 fue el que presentó el mayor número de brotes al inicio del experimento, el cual se mantuvo constante durante todo el período de evaluación. Le sigue el G1 (10800-2) y el G2 (10641-1). Sin embargo es importante mencionar que no existen diferencias significativas entre estos tres genotipos (Anexo 14).

Para el sustrato aserrín el mayor porcentaje fue obtenido por el G1 (48 %), seguido del G2 (22 %), para los G3 y G5 no hay formación de brotes para la última semana (Fig. 32). Existen diferencias significativas de la media del G1 con respecto a las demás medias (Anexo 14).

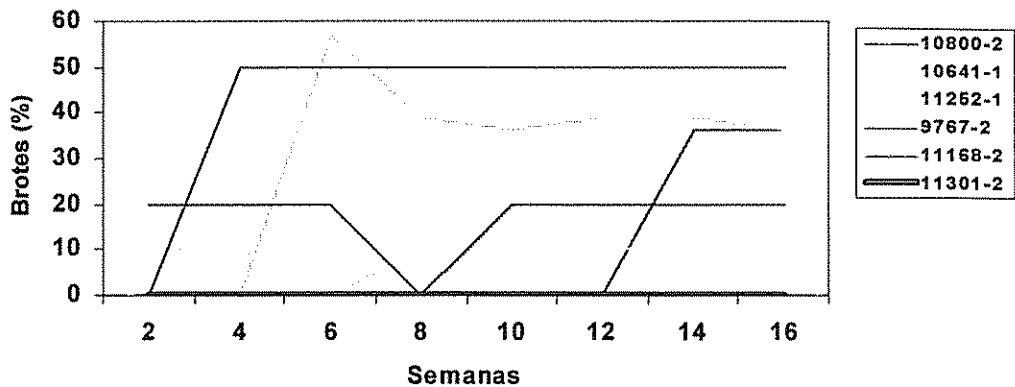


Fig.31. Desarrollo de brote para los genotipos evaluados en el sustrato arena a través del tiempo.

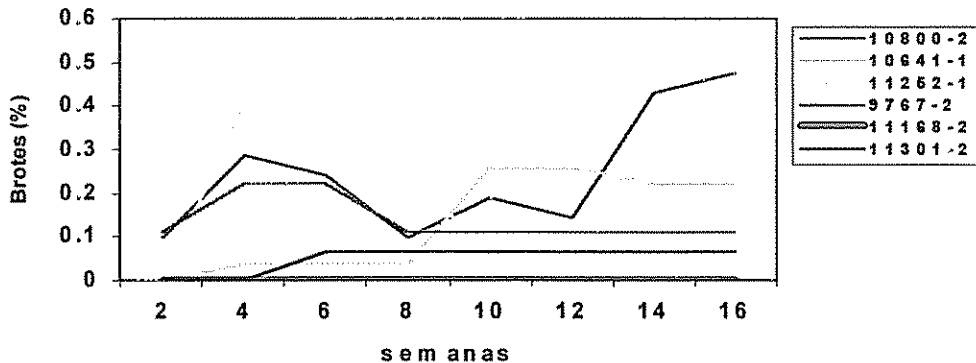


Fig. 32. Desarrollo de brote para los genotipos evaluados en el sustrato aserrín a través del tiempo.

4.2.1.4. Variable enraizamiento

Debido a que solamente una estaca correspondiente al genotipo 10800-2 enraizó en las dos últimas semanas de evaluación ,en el sustrato arena, no se pudo llegar a establecer un análisis estadístico para esta variable. Esta estaca solamente emitió una raíz de coloración blanca un diámetro de aproximadamente 6-7mm y una longitud de 4cm, salida de la parte lateral del tallo de la estaca (Fig. 33).

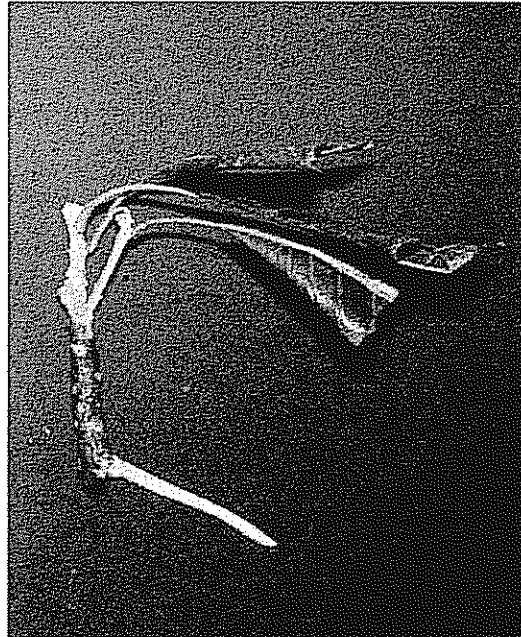


Fig. 33 Enraizamiento de estaca rejuvenecida de *P.sapota* (16 semanas; 0,3% AIB),CATIE, 1998.

4.1.2.2 Segundo ensayo de enraizamiento

Los análisis de varianza para las variables turgencia, callo y presencia de hojas ocho semanas después del establecimiento del segundo ensayo de enraizamiento, se detallan en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Análisis de varianza para las variables turgencia, presencia de callo, presencia de hojas para *Pouteria sapota*. CATIE, 1998.

FV	CUADRADOS MEDIOS Y PROBABILIDADES						
	gl	Turgencia	P	Callo	P	Hojas	P
SUBSTRATO	1	5.947	0.0004**	0.952	0.0041*	0.226	NS
GENOTIPO	5	6.994	NS	3.196	0.0001**	7.878	0.0001**
SUBSTR*GENO	5	0.680	0.0001**	1.272	0.0001**	1.462	0.0005**
SEMANA	7	13.246	0.0001**	0.111	0.0001**	3.924	0.0001**
SUBSTRATO*SEMANA	7	0.355	0.0001**	0.032	0.0033**	0.145	0.0065**
GENOTIPO*SEMANA	35	0.229	0.0001**	0.128	0.0001**	0.060	NS
SUBS*GENO*SEMANA	35	0.106	0.0077**	0.043	0.0001**	0.056	NS

**Significancia del 1%; *significancia del 5%

El comportamiento de las variables fue el siguiente:

4.1.2.2.1 Turgencia

En el Cuadro 5 se observa la presencia de diferencias altamente significativas en la mayoría de factores evaluados, excepto para los diferentes genotipos, en donde no se presentaron diferencias significativas.

En las Figs. 34 y 35 se observa la interacción existente entre los sustratos aserrín y arena y los genotipos evaluados con respecto al tiempo. Tanto para los sustratos arena y aserrín, el G6 (10800-2) fue el que mejor se comportó a lo largo de todo el experimento, presentando siempre porcentajes mayores que el resto de genotipos evaluados; para el G3 (11301-2) se encontró diferencias significativas con respecto al G6, para ambos sustratos (Anexo19). El comportamiento de los otros genotipos fue siempre decreciente y a partir de la

tercera semana se observó pérdida de turgencia de la mayoría de estacas, de manera que para la octava semana, estos genotipos alcanzaron 100% de mortalidad en ambos sustratos.

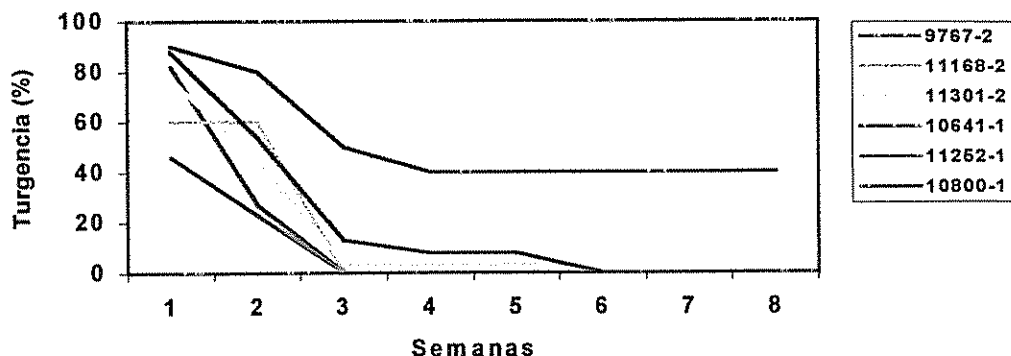


Fig. 34 Turgencia de los genotipos evaluados para el sustrato arena a través del tiempo.

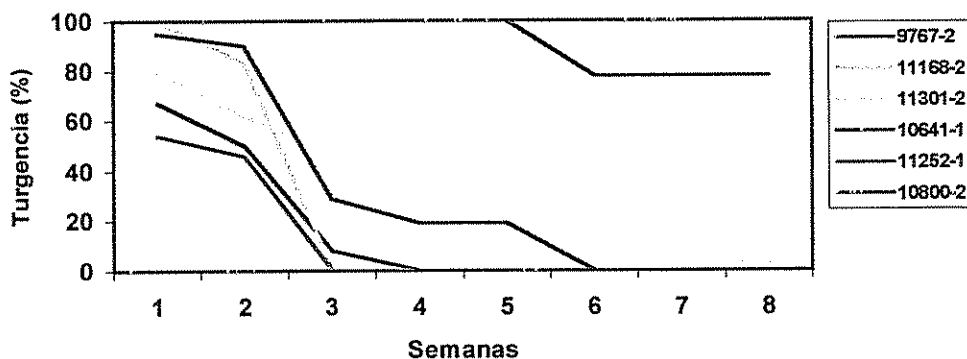


Fig. 35 Turgencia de los genotipos evaluados para el sustrato aserrín a través del tiempo.

Es importante resaltar que de igual manera que en el experimento 1 con brotes rejuvenilizados, el genotipo 10800-2 fue el que presentó el mejor comportamiento, lo que pone de manifiesto su potencialidad de ser propagado con esta técnica.

4.1.2.2.2 Desarrollo de callos

Los análisis estadísticos revelaron que se presentaron diferencias altamente significativas para todos los factores analizados en esta variable (Cuadro 5).

En las Figs. 36 y 37 se explica el comportamiento de los genotipos 10641-1 y 10800-2 en los sustratos de enraizamiento utilizados a través del tiempo.

El G6(10800-2) fue el que presentó las mayores medias tanto en el sustrato arena como en el sustrato aserrín, el porcentaje obtenido para este genotipo en el sustrato arena fue menor que para el sustrato aserrín (20 % y 77 % respectivamente), difiriendo ambas medias significativamente entre sí, como se observa en el Anexo 19. Además se presentó que la media de este genotipo para ambos sustratos difirió significativamente de la media del G3(11301-2) (Anexo 19).

Cabe destacar que el resto de genotipos que fueron evaluados: G1(9767-2); G2 (11168-1); G4(10641-1) y G5(11252-1) no presentaron formación de callos, debido a la pérdida de turgencia de las estacas y su consecuente muerte.

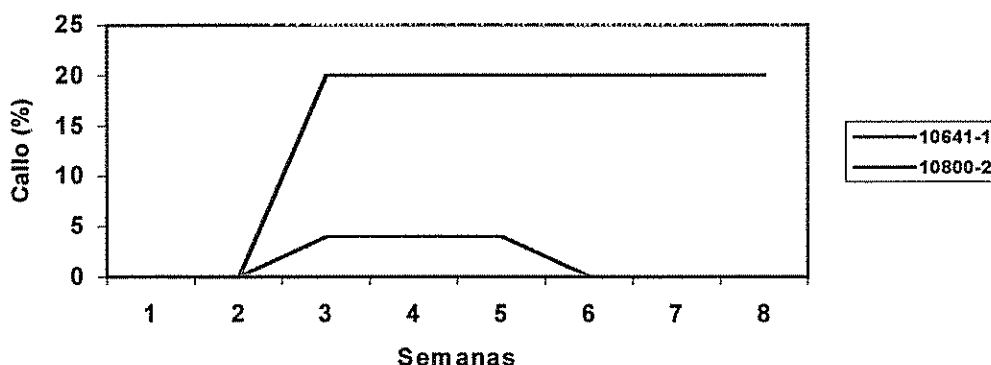


Fig. 36. Desarrollo de callos para los genotipos 10641-1 y 10800-2 en el sustrato arena a través del tiempo.

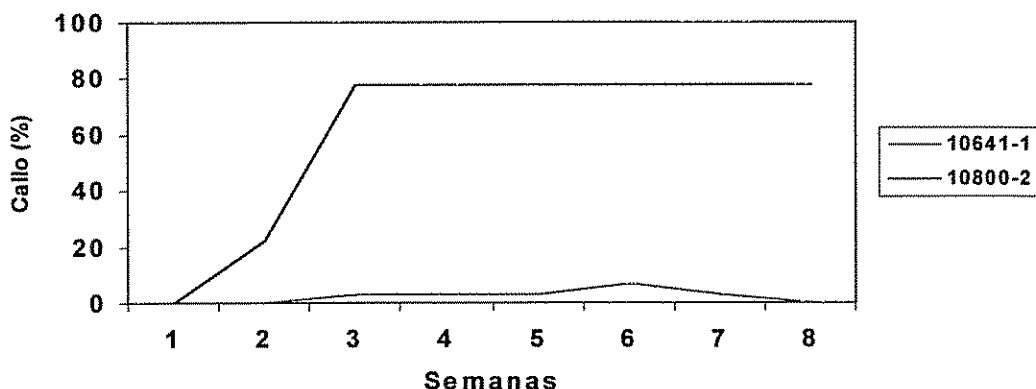


Fig. 37. Desarrollo de callos para los genotipos 10641-1 y 10800-2 en el sustrato aserrín a través del tiempo.

4.1.2.2.3 Presencia de hojas

La presencia de hojas presentó diferencias altamente significativas para las interacciones existentes entre los genotipos utilizados por los sustrato evaluados y entre semanas de evaluación con respecto a los sustratos arena y aserrín (Cuadro 5).

El genotipo 10800-2 es el que presentó el mayor porcentaje de estacas en las que se mantuvieron las hojas para ambos sustratos, siendo mayor este número para el sustrato aserrín (Anexo 20) el cual difirió significativamente de la media obtenida para el sustrato arena (Fig. 38). Además se presentó que a través de las ocho semanas que duró el experimento hubo una tendencia a la disminución de la presencia de hojas, ocasionado por la muerte de la estacas en la mayoría de los genotipos que se estaban evaluando, ya que al final solo quedaban turgentes algunas estacas de los G6 (10800-2) y el G3 (11301-2), lo que se detalla en la Fig. 39. En el Anexo 18 se observa que a partir de la tercera semana no existen diferencias significativas para las medias de los sustratos utilizados, aunque numericamente las media del sustrato aserrín es mayor que la del sustrato arena.

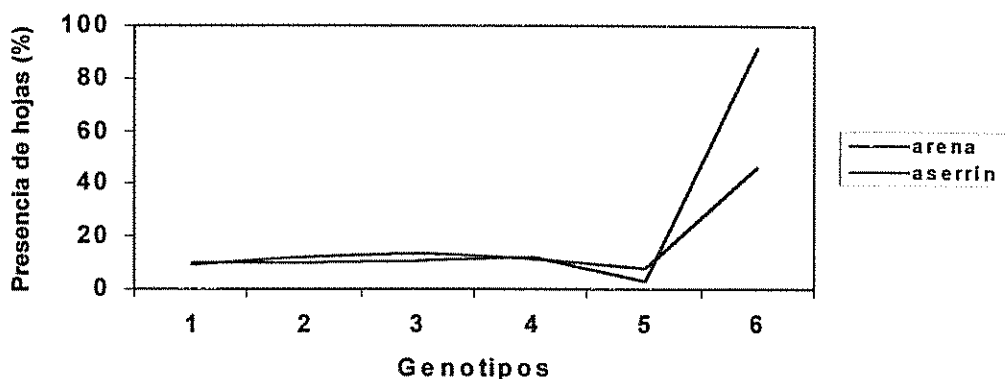


Fig. 38 Presencia de hojas para los genotipos evaluados en los sustratos arena y aserrín.

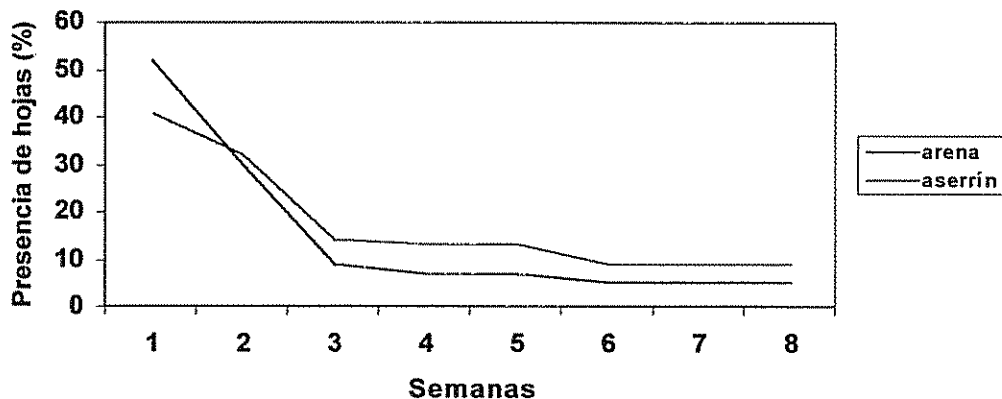


Fig. 39 Presencia de hojas para los sustratos arena y aserrín a través del tiempo.

4.1.2.2.4 Desarrollo de brote

En este ensayo no hubo brotación en ninguna de las estacas durante el tiempo que duró el experimento.

4.1.2.2.5 Enraizamiento

Al igual que en el primer ensayo de enraizamiento solamente una estaca enraizó, correspondiente al genotipo 10800-2 en el sustrato arena. A diferencia de lo encontrado en

el ensayo anterior, la emergencia de la raíz se dio en menor tiempo (8 semanas), y hubo la formación de tres raíces que emergieron tanto de porciones laterales como de la base del tallo (Fig. 40).

Estudios histológicos efectuados a esta raíz, muestran que se origina del parénquima del floema (Fig. 41).

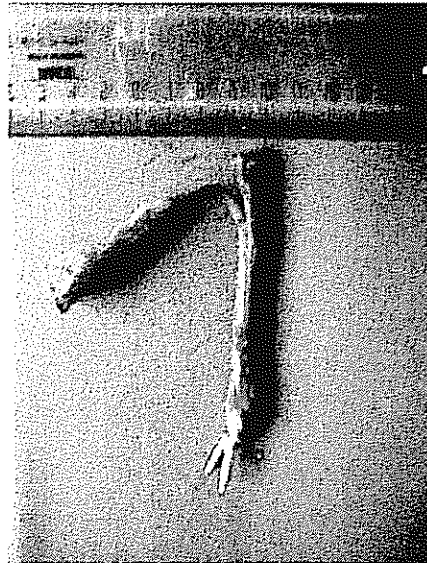


Fig. 40 Enraizamiento de estaca rejuvenecida de *P.sapota* (8^a. semana, 1.2% AIB), CATIE, 1998.

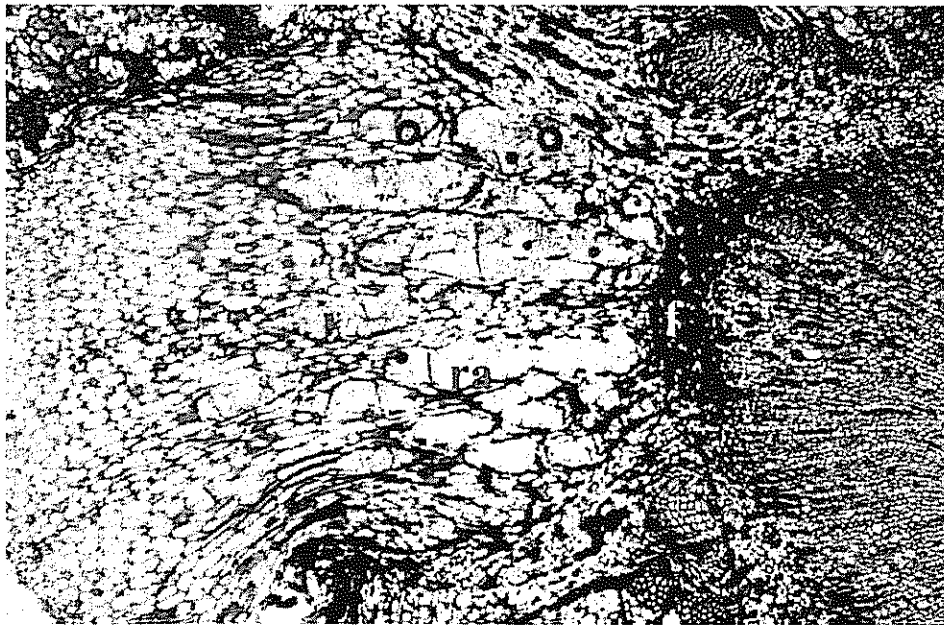


Fig. 41 Sección transversal que muestra la salida de una raíz adventicia a partir del parénquima del floema (f:floema; ra: raíz adventicia). CATIE, 1998.

4. 2 Micropropagación de *Pouteria sapota*.

4.2.1 Cultivo de ápices.

En la presente investigación, en la mayoría de los tratamientos se observó los problemas comunes que se presentan en el establecimiento del cultivo *in vitro* para especies leñosas y herbáceas, debido básicamente a la presencia de contaminación fúngica y bacterial, así como de oxidación de los materiales.

Como se observa en el Anexo 20 las variables sobrevivencia de ápices y contaminación fúngica fueron las que resultaron ser estadísticamente significativas para el conjunto de desinfecciones que se evaluaron.

No se presentaron diferencias estadísticas significativas en lo que respecta a la contaminación por bacterias (Anexo 21), aunque si existió variación del comportamiento de este agente microbial a través del tiempo, notándose porcentajes bastante bajos, que alcanzan un 13% como máximo (Cuadro 6).

En el caso de los ápices oxidados tampoco se observó diferencias significativas con la utilización de los diferentes tratamientos, ya que muy pocos de los ápices utilizados presentaron oxidación de sus tejidos (7%).

En el Cuadro 6 se observa el resultado de los ocho tratamientos de desinfección para ápices de *Pouteria sapota*.

Cuadro 6 Porcentajes de ápices sanos, contaminados con hongos, bacterias y oxidados 16 días después de iniciado el ensayo. CATIE, 1998.

Desinfección(*)	Sanos(%)	Hongos(%)	Bact (%) ^{ns}	Oxid (%) ^{ns}
D1: NaClO**(0.53%)+NaClO(1.06%)15'	100 a	0 c	0	0
D2: " +Benlate(10')	60 d	33 a	7	0
D3: " +Ácido cítrico	80 bc	7 bc	13	0
D4: "	93 ab	0 c	0	7
D5: Ca(ClO) ₂ ***(5%)+ Ca(ClO) ₂ (10%) 15'	100 ab	0 c	0	0
D6: " +Benlate (10')	93 ab	0 c	7	0
D7: " +Ácido cítrico	80 bc	7 bc	13	0
D8: "	73 c	14 b	13	0

*En todas las desinfecciones los ápices fueron lavados con algodón, agua y jabón, y se utilizó alcohol (70%) por 1'.

NaClO: Hipoclorito de sodio; *Ca(ClO)₂: Hipoclorito de calcio; ns: no significativo al 5 %

En lo que respecta a la sobrevivencia de los explantes (ápices sanos) el análisis de varianza indica que existió influencia de los tratamientos desinfectantes sobre el porcentaje de ápices sanos (Anexo 21). Así por ejemplo la desinfección fue adecuada cuando se utilizó alcohol al 70% por un minuto más la doble desinfección de hipoclorito de sodio al 0.53% y 1.06% por quince minutos; además de ácido cítrico en el enjuague final (D3), o bien, como en el caso de la D1, donde no se hizo uso del ácido cítrico. Ambas desinfecciones muestran diferencias significativas (Anexo 22) donde el porcentaje de ápices sanos para la desinfección D3 fue de 80%, mientras que en la desinfección D1 fue de 100% (Cuadro 6).

En la D2 donde se utilizó benlate junto con hipoclorito de sodio, se observó un efecto detrimental sobre los explantes, ya que si los comparamos con las otras desinfecciones se tiene solamente sobrevivencia de un 60% de ápices después de 16 días de iniciado el experimento.

Los resultados muestran que la contaminación por hongos fue la causa más importante de pérdida de ápices. La D2 presentó los mayores porcentajes de contaminación y su promedio difirió significativamente de los promedios de las otras desinfecciones (Anexo 22).

Es interesante destacar las desinfecciones D4, D5, D6 y D7 donde no se presentó contaminación. No obstante, estos tratamientos parecen ser demasiado fuertes para el tipo de material, lo que pudo haber afectado la reactividad de los explantes. Para las desinfecciones D1 y D3, algunos de los ápices introducidos mostraron reactividad, presentando una coloración verde intensa, además de que empezaron a desarrollar sus primordios foliares (Fig. 44).

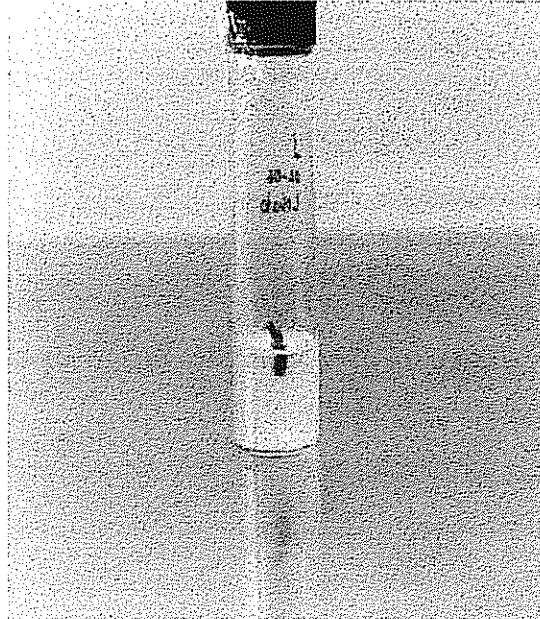


Fig. 42 Ápice de *Pouteria sapota* cultivado *in vitro* (segunda semana después de iniciada la siembra). CATIE, 1998.

También, aquellos ápices en los que se aplicaron los tratamientos D5, D6, D7 y D8 que consistieron de una doble desinfección de hipoclorito de calcio (5 y 10%) mostraron decoloración, la cual se volvió muy intensa en algunas áreas del ápice, dando la apariencia de haber sido quemados al aplicarles dicha solución.

La selección de los tratamientos D1 y D3 y su aplicación a nuevos explantes de *P. viridis* en otra época de siembra reveló como se detalla en el Anexo 23 la presencia de diferencias significativas para las variables ápices sanos, contaminados con hongos y oxidados.

No se presentaron diferencias estadísticas significativas para los ápices contaminados con bacteria.

Cuadro 7 Porcentajes de ápices sanos, contaminados por hongos y oxidados 12 días después de iniciado el experimento. CATIE, 1998.

Desinfección	Sanos(%)	Bacteria(%) ^{ms}	Hongos (%)	Oxidación (%)
D2:NaClO** (0,53%)+NaClO(1.06%)15'	14 a	36	2 b	36 b
D3: " + ácido cítrico	10 a	24	20 a	62 a

*En todas las desinfecciones los ápices fueron lavados con algodón, agua y jabón, y se utilizó alcohol (70%) por 1'.

**NaClO: Hipoclorito de sodio.

Como se puede apreciar en el Cuadro 7, a pesar de que ambas desinfecciones en el caso anterior mostraron porcentajes bajos de contaminación, las mejores desinfecciones aplicadas un mes después no proporcionaron los resultados esperados, obteniéndose mayores porcentajes de contaminación por bacteria, hongos y oxidación de los materiales.

Se puede observar además que en cuanto a la sobrevivencia de los ápices (presencia de ápices sanos), no existen diferencias significativas entre ambas desinfecciones, ya que sus promedios son bastante similares, aunque numéricamente en la D3 se presentó un mayor porcentaje de ápices sin contaminación (Cuadro 7).

En el Cuadro 7, se presenta diferencia entre ambas desinfecciones utilizadas con respecto a contaminación bacteriana de los ápices, presentando la D2 el mayor porcentaje de ápices contaminados con bacteria, lo cual concuerda con lo encontrado en el experimento anterior, en donde la utilización de esta desinfección presentó un mayor porcentaje de contaminación microbiana. Lo contrario se presenta para la oxidación de los materiales, en donde se observa que para la D3 aumentó de manera considerable el número de ápices oxidados (62%), lo cual constituye la causa principal de pérdida del material introducido, presentando como se detalla en el Anexo 25, diferencias estadísticas significativas para ambas desinfecciones utilizadas. Nuevamente la D3 fue la que presentó una mayor reactividad por

parte de los ápices, mostrándose coloraciones verde intenso y la iniciación del desarrollo de sus primordios foliares.

Estos primeros resultados permitieron definir cinco nuevos tratamientos de desinfección los cuales se utilizaron en ápices de *P. sapota*.

Se presentaron diferencias estadísticamente significativas (Anexo 26) en las variables contaminación por hongos, por bacteria y presencia de ápices oxidados, con respecto al conjunto de desinfecciones que se utilizaron.

En el caso de la sobrevivencia de los ápices, no se presentaron diferencias significativas entre las diferentes desinfecciones que se utilizaron con respecto a los días después de iniciado el experimento.

Cuadro 8 Porcentajes de ápices sanos y contaminados con hongos, bacterias y oxidados 16 días después de iniciado el ensayo. CATIE, 1998.

Desinfección(*)	Sanos (%) ^{ns}	Hongos (%)	Bacterias (%)	Oxidados (%)
E1: alcohol 70% (1')	0	60 b	10 b	30 b
E2: " + NaClO** 0,53% (10')	40	10 cd	10 b	40 b
E3: " +Na ClO 1,06% (10')	60	20 c	0 b	10 c
E4: " +NaClO 0,53%+ NaClO 1,06% (10')	20	0 d	0 b	80 a
E5: NaClO 0,53% (10')	0	90 a	30 a	10 b

*En todas las desinfecciones los ápices fueron lavados con algodón, agua y jabón, y se utilizó alcohol (70%) por 1'.

**NaClO: Hipoclorito de sodio; ns: no significativo al 5%.

Como se observa en el Cuadro 8 la desinfección E5 donde no se utilizó alcohol fue la que presentó mayor contaminación fúngica (90%) y este promedio difirió significativamente de las otros promedios que se evaluaron (Anexo 27). Así mismo, la desinfección E1 en donde solamente se utilizó alcohol, presentó un 60% de contaminación por hongos, lo cual difirió significativamente de los promedios de las otras desinfecciones utilizadas. A su vez se tiene

que la desinfección E4 donde se utilizó una doble desinfección con hipoclorito de sodio presentó los menores porcentajes de contaminación por hongos (0%).

Con respecto a la contaminación por bacteria, la desinfección E5 nuevamente fue la que presentó la mayor contaminación (30%) por este agente; ésta difirió significativamente de la media de las otras desinfecciones utilizadas (Anexo 27). Las desinfecciones que menores porcentajes de contaminación presentaron fueron las desinfecciones E3 y E4, las cuales no difirieron significativamente entre sí (Cuadro 8).

La oxidación de los materiales fue mayor para la desinfección E4 donde se utilizó la doble desinfección de hipoclorito de sodio (80%); el promedio de esta desinfección difirió significativamente de la media de las otras desinfecciones (Anexo 27). A partir de los porcentajes de oxidación obtenidos, esta variable representa una fuente importante de pérdida del material. El menor porcentaje de oxidación de materiales se presentó para las desinfecciones E3 y E5, y sus respectivos promedios no difirieron estadísticamente entre sí (Anexo 27).

Una vez más se seleccionó los dos mejores tratamientos, los cuales también se utilizaron en el cultivo de ápices de *Pouteria sapota*. Se encontró a través del análisis estadístico que existen diferencias significativas en las desinfecciones en cuanto a sobrevivencia de los ápices, contaminación por hongos y oxidación de los materiales (Anexo 28).

La variable ápices contaminados con bacterias presentó diferencias solamente en su comportamiento a través del tiempo, no así entre las desinfecciones utilizadas, con una tendencia a que se incrementen los porcentajes de contaminación conforme transcurren los días después de iniciado el ensayo. Los porcentajes altos de este contaminante en el caso de la desinfección E1, provocó la pérdida de más del 50% de los ápices que se habían introducido.

Cuadro 9 Porcentajes de ápices sanos, contaminados con hongos, bacterias y oxidados 16 días después de iniciado el experimento. CATIE, 1998.

Desinfección	Sanos (%)	Bacteria(%) ^{ns}	Hongos (%)	Oxidados (%)
E3: NaClO (1.06%) 10'	10 a	52	20 a	36 b
E4: " +NaClO (0,53%)10'	16 a	36	2 b	62 a

*En todas las desinfecciones los ápices fueron lavados con algodón, agua y jabón, y se utilizó alcohol (70%) por 1'.

**NaClO: Hipoclorito de sodio; ns: no significativo al 5%.

En el Cuadro 8 se observa que la sobrevivencia de los ápices el tratamiento en el que se utilizó una doble desinfección de hipoclorito de sodio proporciona numéricamente un menor número de ápices contaminados con hongos, sin embargo existen diferencias significativas entre ambas desinfecciones (Anexo 29). Es de destacar los bajos porcentajes de ápices que sobrevivieron con la utilización de estos tratamientos.

Con la utilización de la doble desinfección de hipoclorito de sodio se presentó menor porcentaje de contaminación fúngica que cuando solamente se utilizó hipoclorito de sodio (1.06%), existiendo diferencias entre ambas medias (Anexo 29).

Sin embargo, la primera de ellas fue la que provocó mayores porcentajes de oxidación de materiales (62%); los promedios de esta desinfección difirieron estadísticamente entre sí (Anexo 29). Nuevamente, la disminución de la sobrevivencia de los ápices se ve afectado por la oxidación de los materiales, constituyéndose en una barrera importante para el éxito en la micropropagación para esta especie, ya que por ejemplo, como se mencionó para la E4, llegó a perderse más del 60% de los ápices que se habían introducido *in vitro*.

Una vez que se determinó que la oxidación de los materiales representaba una fuente importante de pérdidas del material introducido *in vitro*, se procedió a la utilización de dos agentes antioxidantes. Los análisis de varianza para las variables evaluadas se detallan en el Anexo 30.

De los análisis estadísticos que se efectuaron (Anexo 30) solamente el comportamiento de los ápices con respecto al tiempo no presentó diferencias significativas, el resto de variables evaluadas presentó diferencias significativas.

Cuadro 10 Porcentajes de ápices sanos, contaminados con hongos, bacterias y oxidados 16 días después de iniciada la siembra, CATIE, 1998.

Agente anti oxidante	Oxidados
AG 1: ácido cítrico	37 a
AG 2: “ + carbón activado	12 b

*En todas las desinfecciones los ápices fueron lavados con algodón, agua y jabón, y se utilizó alcohol (70%) por 1' además de una doble desinfección de Hipoclorito de sodio al 0,53% y 1.06% por 10'.

El tratamiento en el que se utilizó carbón activado más ácido cítrico como se observa en el Cuadro 10, es el que permite un menor porcentaje de ápices oxidados (12%), presentando diferencia de medias significativas (Anexo 31) con respecto al tratamiento en donde se utilizó solamente ácido cítrico donde los porcentajes de ápices oxidados fueron mayores (37%).

4.2.2 Microinjertos

Los resultados preliminares del uso de la técnica de microinjerto en zapote permiten determinar que el injerto de enchape lateral tiene potencialidad para expresar una respuesta del ápice en cultivo *in vitro*.

Estudios histológicos efectuados en este injerto muestran que existe reactivación de las capas de parénquima cortical del portainjerto, así como reactivación de parénquima cortical del injerto, formando tejido meristemático con células pequeñas rectangulares, similares a las células cambiales (Fig. 43); se aprecia además el inicio de la formación del tejido vascular en dichas capas que se están dividiendo, sin embargo, no se logró observar una conexión vascular completa entre el patrón y el injerto.

En la Fig. 44 se nos presenta el área de unión entre el patrón y el injerto.

Cuando se utilizó la técnica de enchape lateral los ápices injerto se mantuvieron turgentes dos semanas después de iniciado el injerto, no obstante se observó que conforme pasaban los días la pérdida de turgencia y la consecuente muerte de ellos fue incrementándose, llegando a una mortalidad total de los microinjertos evaluados al final de la segunda semana.

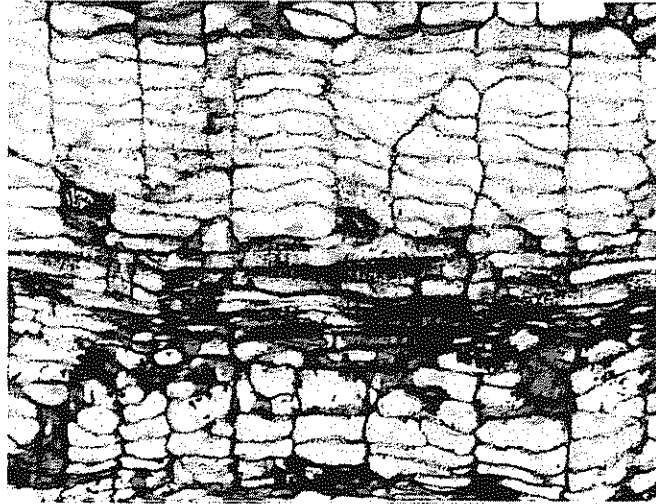


Fig. 43 Divisiones periclinales en el parénquima del portainjerto y del ápice para formar el punto de unión entre ambos. CATIE, 1998.



Fig. 44 Sección longitudinal donde se muestra el punto de unión entre el portainjerto y el ápices injerto (a:ápice; pi:portainjerto; zc: zona de cicatrización).

5 DISCUSIÓN

5-1 Macropropagación de la especie

5.1.1 Ensayo de injertación.

La propagación vegetativa por medio de las técnicas de injertación tiene un papel importante para zapote, ya que ésta especie se considera de difícil propagación, y normalmente se ha propagado por semillas (Quilantan-Carreón, 1979).

A partir de los resultados obtenidos para la longitud y sobrevivencia de los injertos se pudo llegar a establecer que las condiciones de invernadero fueron las más favorables para el desarrollo de los injertos. A su vez, dicha condición influencia de manera positiva la respuesta de los diferentes genotipos, ya que los mayores valores promedio se presentaron aquí, lo cual parece indicar que mucha de la respuesta obtenida en éstos genotipos variará de acuerdo a condicionantes de tipo ambiental que afectan directamente el desarrollo y prendimiento del mismo.

Para el genotipo G3 no se encontró diferencia en el desarrollo del injerto (longitud), lo cual sugiere que éste es más apto para desarrollarse, de acuerdo a las condiciones del medio ambiente en las que se encuentre. Las diferencias encontradas entre los G2 y G3 en condiciones de invernadero y entre el G3 con respecto a los otros genotipos en las condiciones de campo, sugiere la existencia de genotipos con mayor predisposición al desarrollo del injerto dentro del género.

De acuerdo a Guardián (1970) y Rojas (1972) las respuestas encontradas en la condición soleada pueden deberse a la pérdida de humedad por parte de las varetas, ocasionada por la incidencia directa de los rayos solares, mientras que para las condiciones de invernadero esas condiciones de radiación son controladas y la incidencia es indirecta, provocando una menor exposición de los injertos a la deshidratación

A su vez, en la sobrevivencia de los injertos existe una clara diferencia en cuanto al comportamiento de los genotipos utilizando la técnica de injerto de enchape lateral. Tradicionalmente el uso de esta técnica ha resultado exitosa para los injertos de esta especie, de acuerdo a lo obtenido por Quilantan-Carreón (1979) y Malo (1970 b). Esto puede deberse a que la superficie de contacto en la región del cambium entre el patrón y el injerto es mayor al injerto de corona, de manera que se produce suficiente cantidad de auxinas que estimulan la división celular, y por tanto, la unión de células parenquimatosas del injerto con células del cambium del portainjerto que pueden afectar directamente las uniones de los injertos, así como estimular el crecimiento de los mismos (Hartmann y Kester, 1990).

Resultados obtenidos por Malo (1970 a) y Odgen (1984) muestran porcentajes de prendimiento de 80-90% utilizando la técnica de injerto de enchape lateral. En el presente trabajo, los mejores resultados fueron los obtenidos utilizando la técnica antes mencionada (50%) con patrones de 3 meses de edad. Si se compara ambos resultados, la injertación con plantas de 3 meses no fue tan exitosa como la anterior; no obstante, son los primeros trabajos que se realizan con plantas tan jóvenes, y probablemente se requiere afinar un poco más la técnica, ya que su utilización representaría una disminución del ciclo de la especie, facilitaría su manipulación y se evitarían los problemas de un pobre desarrollo o malformación radical presentes en patrones de mayor edad.

Entre los factores que pudieron estar afectando los prendimientos encontrados en zapote en la presente investigación se encuentran:

Factores anatómicos y fisiológicos los cuales son muy importantes para la injertación en esta especie. Entre ellos se destaca una banda de fibras en la corteza de los tallos, que constituye una barrera física, ya que al parecer esta puede interferir con la desdiferenciación de los tejidos en la formación de la unión del injerto. Lo anterior pudo observarse claramente en el estudio histológico efectuado a diferentes genotipos bajo estudio.

Así mismo, se cita un cambium irregular y discontinuo como un problema que afecta directamente el prendimiento de los injertos; no obstante, en los cortes histológicos efectuados a diferentes genotipos durante el ensayo, se encontró un cambium bastante regular y continuo que sugiere que este tejido no es un problema para el establecimiento de la unión patrón-injerto. Un factor que también puede ocasionar problemas con la injertación es el alto contenido de sílice en el tejido cortical de los tallos de zapote (Odgen, 1984), situación que tampoco se observó en los cortes efectuados durante este experimento.

Autores como Quilantan –Carreón (1979) Campbell *et al.* (1984), Almeyda y Martín (1976), Lazo (1965) y Rodríguez Guardian (1985) mencionan que la presencia del látex liberado por la herida es una de las principales razones para el bajo prendimiento en esta especie, ya que el látex interfiere con la formación y unión del injerto. Estudios histológicos efectuados en la presente investigación a diferentes genotipos de esta especie muestran diferencias en cuanto a número de canales gomíferos presentes; existen genotipos que presentan una corteza con un mayor número de estos canales y existen otros genotipos en los cuales existe menor presencia de éstos. Por lo tanto, puede constituirse en un factor que afecte los prendimientos obtenidos en la presente investigación, dado que aquellos genotipos en los cuales se halla un mayor número de estos canales presentarán una tendencia a una mayor pudrición producto de una mayor secreción de látex en el sitio de unión del injerto.

5.1.2 Ensayos de enraizamiento de estacas.

Las técnicas de propagación vegetativa se están incrementando continuamente a un rango de especies de árboles tropicales con el fin de mejorar la calidad de muchos productos forestales (Leakey, 1987) y además conservar germoplasma (Leakey *et al.*, 1982; Newton *et al.*, 1992)

Los resultados del presente estudio muestran que las estacas de brotes tanto rejuvenecidos como maduros no enraizan bien, bajo las condiciones a las que se sometieron, lo

cual concuerda con los resultados encontrados en el MITA (Almeyda y Martín, 1976) y por Guevara (1977).

La capacidad de enraizamiento, de acuerdo a Hartmann y Kester (1990) varía entre las especies e incluso entre procedencias, según un conjunto de condicionantes de tipo exógeno y endógeno, así como por factores genéticos involucrados.

En el presente estudio los principales factores que pudieron haber afectado su respuesta son posiblemente de carácter endógeno.

Según Leakey y Mesén (1991) la baja capacidad de enraizamiento de estacas provenientes de material adulto, se puede deber a que en la copa de los árboles, los brotes están compitiendo tanto por agua como por nutrientes debido al efecto de sombreamiento que se da. En dicho material también es posible que las funciones de los genes estén más definidas hacia la producción de ciertas estructuras, siendo más difícil que las células regresen al estado meristemático. Esto podría contribuir a explicar por qué tanto en las pruebas preliminares de material adulto, así como en brotes rejuvenilizados, no hubo desarrollo de raíces. De acuerdo a Hartmann y Kester (1990), este fenómeno de poco enraizamiento de estacas adultas puede explicarse por la producción creciente de inhibidores de enraizamiento conforme la planta madura, o por la disminución de niveles de fenol en la planta, el cual se cree que actúa como cofactor de la auxina o como sinergista en la iniciación de raíces.

Estudios histológicos realizados al material de mejor respuesta (G1), así como al genotipo que más rápidamente se deterioró (G3), permitieron observar una banda gruesa de fibras de paredes muy gruesas en la región cercana al floema para ambos genotipos. Igualmente se aprecian rayos uniseriados con contenido fenólico y en ocasiones rodeados por fibras. De acuerdo con Flores (1994), la capacidad de enraizamiento de una especie es variable, y las estacas con rayos vasculares angostas enraizan con dificultad. Así mismo, estacas con canales laticíferos presentan dificultad de enraizamiento y mucha podredumbre. Con respecto a la banda de fibras, estas pueden constituir una barrera física para la

propagación de esta especie, razón por la cual sería recomendable producir una herida en la base del tallo, con el fin de romperla o evadirla (Mesén, comunicación personal, 1998). Por otro lado, el excesivo número de canales secretores en la corteza y médula del genotipo 11252-1, pueden influir en su baja respuesta.

Cortes histológicos realizados al final del experimento en estas estacas, mostraron células muy deterioradas a nivel de elementos conductores (obstrucción, taponeamiento), además de células del parénquima colapsadas, destrucción de paredes, levantamiento de peridermis; así como también mucha contaminación por micelio y esporas de hongos, que prácticamente estaría impidiendo la formación de raíces después de pasado el tiempo de evaluación con el que se trabajó en ambos ensayos.

Otro de los factores que pudieron afectar la respuesta pudieron ser los efectos contrastantes de las hojas sobre el proceso de propagación (Mesén, 1997). Por un lado, el efecto estimulador de las hojas sobre el enraizamiento se ha asociado a la actividad fotosintética de las mismas, lo cual contribuye a proporcionar asimilados a las raíces en desarrollo (Leakey y Coutts, 1989), y a la producción de auxinas y otras sustancias promotoras del enraizamiento.

Por otro lado, la pérdida de agua por transpiración puede causar déficits hídricos en las estacas a grados tales que pueden reducir el enraizamiento o incluso causar la muerte de las mismas (Loach, 1988). En el presente ensayo, las estacas que enraizaron tenían aún presente la hoja al momento de desarrollar la raíz, lo que se indica que estas son importantes para estimular el enraizamiento, ya sea por su correlación con la producción de promotores auxínicos (Wilson, 1994), o por la producción de carbohidratos derivados de la fotosíntesis, los cuales funcionan como fuente de energía para que se efectúe el proceso de formación de la raíz (Haissig, 1986).

Para el ensayo 1 se obtuvieron mayores promedios relacionados con la presencia de hojas en el sustrato arena que en el sustrato aserrín, lo cual, según lo encontrado por Nuñez

(1997) en estacas de *P. pinnatum*, *H. alchorneoides* y *T. oblonga*, puede estar relacionado con la susceptibilidad que dichas especies presentan a altas concentraciones de etileno cuando se utiliza el sustrato aserrín. Según Kramer (1983) y Salisbury y Ross (1994) citados por Nuñez (1997) el etileno puede producir daños en los tejidos al contribuir con la síntesis de celulasa, enzima que hidroliza la celulosa y produce la degradación en las paredes celulares con la consecuente muerte de los tejidos.

A pesar de que en el ensayo 2 los mayores promedios se obtuvieron con la presencia de hojas en el sustrato aserrín, esto no tuvo un efecto significativo para la formación de raíces, ya que no hubo la formación de raíces por parte de las estacas.

En el ensayo 2 no hubo desarrollo de brotes, lo cual de acuerdo con Mesén (1997) posiblemente está relacionado con las escasas reservas y la baja tasa de fotosíntesis en las estacas que no fueron suficientes para estimular la producción de brotes. Esto se encuentra muy ligado con el estado fisiológico de las plantas donantes al momento de tomar las estacas. En la presente investigación la toma de las estacas coincidió con la época en la que los árboles de zapote se encuentran con el follaje maduro y con el inicio de la fructificación, y donde parte de sus reservas irán a suplir esas necesidades.

Lo mencionado anteriormente también puede explicar que la diferencia encontrada entre la pérdida de turgencia de las estacas; presencia de hojas y desarrollo de callo para los ensayos 1 y 2, pueda deberse a las condiciones fisiológicas de la planta donante al momento de efectuar la corta de las estacas rejuvenilizadas. Para la fecha en la que se efectuó el primer ensayo los árboles se encontraban en estado de reposo, preparándose para la fructificación, con pérdida de la mayoría de sus hojas, y por lo tanto, con la presencia de sustancias de reserva que le ayudarán para continuar su ciclo reproductivo; mientras que para la fecha del segundo ensayo, los árboles se encontraban con prácticamente todo el follaje adulto e iniciando la fructificación, por lo tanto, todas las reservas del árbol suplirían estas necesidades. La iniciación de las raíces en estacas requiere de energía. Considerando que las sustancias lipídicas normalmente no son abundantes en los tallos, la degradación de los carbohidratos se

constituye principalmente en una fuente de energía en la estaca para activar el proceso rizogénico, señalándose el almidón, cuando está presente, como fuente principal para el desarrollo del primordio radical. De acuerdo a Veierskov (1988) si las estacas son desprovistas de carbohidratos y sucesivamente son enraizadas bajo condiciones donde la fotosíntesis no pueda ocurrir, la carga energética para sustentar el enraizamiento será reducida.

Algunos investigadores han correlacionado positivamente los niveles de carbohidratos en las estacas con su capacidad para iniciar primordios radicales, reconociendo que una adecuada reserva de hidratos de carbono, en combinación con una relación carbono/nitrógeno alta, favorecen el enraizamiento (Gutiérrez, 1995)

Dentro del ensayo, uno de los factores exógenos medidos que pudiera afectar la respuesta de las variables analizadas fue el sustrato de enraizamiento; cada especie tiene sus requerimientos particulares en cuanto a dicho sustrato, aparentemente asociado al balance entre agua y aire del mismo (Loach, 1988). Las influencias del medio de enraizamiento en relación a la toma de agua por parte de las estacas están relacionados con la resistencia que ejerce el medio en la absorción, probablemente a causa del contacto incompleto de la base de la estaca con la película de agua que se encuentra alrededor de las partículas del medio (Grange y Loach, 1983). Para la mayoría de genotipos evaluados en este experimento el sustrato arena proporcionó los mejores resultados en cuanto a formación de callos, igualmente, la única estaca que enraizó fue en este sustrato. Resultados similares fueron encontrados en un rango amplio de especies forestales como *Gmelina arborea*, *Cedrela odorata*, *Vochysia guatemalensis* e *Inga dulcis* entre otras, en donde los mejores resultados se han dado utilizando este sustrato.

En especies de fácil enraizamiento se ha observado que la aplicación exógena de una auxina sintética incrementa sustancialmente el movimiento de carbohidratos, compuestos nitrogenados y otros, desde el ápice hacia la base de la estaca, favoreciendo el fenómeno rizogénico (Gutiérrez, 1995). A pesar de que se ha demostrado ampliamente la influencia de dicho factor en la formación de raíces laterales, en el presente estudio no pudo constatararse, ya

que a pesar de que se utilizaron concentraciones diferentes de AIB, en ambos ensayos el resultado fue prácticamente similar, debido a que hubo enraizamiento de una sola estaca perteneciente al mismo genotipo, y desarrollado en el mismo sustrato. Sin embargo, sí se presentaron diferencias en lo que respecta al tiempo en el cual la estaca emergió, que fue menor cuando se utilizó la concentración mayor de AIB; además de que también se presentó un desarrollo mayor tanto en número de raíces, como en su tamaño. Al respecto, Haissig (1974 a) menciona que a pesar de que las auxinas estimulan el desarrollo de primordios radicales, éstas por sí solas no inducen la iniciación de primordios. Aparentemente en estacas de difícil enraizamiento, estas pierden la predisposición al desarrollo de estos primordios la cual está determinada por la presencia en la estaca de auxinas sinergista (cofactores) que favorecerán el proceso de iniciación de raíces.

5.2 Micropropagación de la especie.

5.2.1 Cultivo de ápices *in vitro*.

La micropropagación está siendo utilizada extensivamente para la propagación clonal de muchas especies frutales, árboles ornamentales y forestales (Zimmerman, 1985; Hammerschlog, 1986), ya que esto hace posible una propagación más rápida y apresura la disponibilidad de nuevas variedades (Zimmerman, 1981). Para el éxito en todo programa de micropropagación la iniciación del cultivo es un primer paso crítico para cualquier planta (Constantine, 1986); sobre todo en lo que respecta a especies tropicales arbóreas. A pesar de lo anterior, las investigaciones efectuadas en este campo son pocas, si se compara con las efectuadas en especies de clima templado (Rao y Lee, 1982; Rao, 1986)

Según Biondi y Thorpe (1982) y Skirvin (1981) el establecimiento *in vitro* de especies arbóreas tropicales es difícil de lograr. Entre los problemas a los que se enfrenta el desarrollo de la técnica se encuentran pérdidas debidas a contaminación fúngica y bacterial o la oxidación de compuestos fenólicos liberados por el desorden celular ocasionado por la herida, provocando que cuando ocurre una polimerización de éstos junto con la proteínas cause una

inhibición del crecimiento o la muerte de los explantes para un amplio rango de especies (Christiensen y Fønnesbech, 1975; Harms *et al.* 1983; Hildebrandt y Harney, 1988).

Las pérdidas debidas a contaminación fúngica o bacteriana pueden ser minimizadas ya sea mediante el uso de tratamientos previos o en la introducción *in vitro* por medio de la utilización de químicos (George y Sherrington, 1984), lo cual es el procedimiento rutinariamente utilizado para el control de este tipo de agentes (Holland y Polacco, 1994). Para el caso de las pérdidas ocasionadas por oxidación, éstas se han prevenido tratando de remover los compuestos fenólicos, modificando el potencial de oxidación-reducción e inactivando las enzimas, entre otros (George y Sherrington, 1984).

Se encontró que la oxidación de los materiales, fue una de las causas más importantes de la pérdida de ápices durante la introducción *in vitro*. Durante las primeras introducciones los porcentajes de oxidación prácticamente no fueron significativos, lo cual parece responder a condiciones climáticas que estaban afectando la fenología del cultivo, ya que de acuerdo a Roca (1996), la producción de fenoles en el interior de las células se incrementa durante las épocas de mayor precipitación. Las primeras desinfecciones que se utilizaron se evaluaron en época de baja precipitación, lo cual posiblemente permitió una disminución en la producción de dichos fenoles.

Para prevenir la alta incidencia de la oxidación de materiales, la utilización de carbón activado proporcionó una reducción en el número de ápices que presentaban esta condición. Al respecto, se ha encontrado que el carbón activado tiende a reducir la oxidación del explante, ya que de acuerdo a Ebert y Taylor (1990) absorbe los compuestos fenólicos de los explantes y mejora el crecimiento de los brotes. Se ha encontrado que los efectos del carbón activado sobre los explantes son debidos a la remoción de sustancias del medio que promoverían un crecimiento sin organización, inhibición de la embriogénesis, formación y alargamiento radical (George y Sherrington, 1984).

Otro factor importante es que aquellas desinfecciones en las que se utilizó un agente desinfectante en mayores concentraciones actuaban de manera conjunta con la producción de fenoles por parte de los explantes de esta especie. Según Ravindra y Thomas (1997) en ápices de mango la aplicación de diferentes tipos de desinfectantes y concentraciones de los mismos en los tratamientos con frecuencia estimulan la exudación de fenoles.

Con respecto a la contaminación fúngica, de acuerdo a los resultados obtenidos se ve que está influenciada por el tipo de agente desinfectante que se utilice para su control. En el presente estudio se logró un control aceptable utilizando una doble desinfección con hipoclorito de sodio en una concentración alta, lo cual hace suponer que para eliminar la contaminación en esta especie se necesitan concentraciones altas de este agente desinfectante. De acuerdo a Bonga y Aderkas (1992) es probado que materiales que provienen de especies leñosas necesitan concentraciones más altas de agentes desinfectantes. Cuando se utilizan concentraciones menores de este agente se presentan mayores porcentajes de contaminación. Estos resultados comprueban lo obtenido por Roca (1996) en sapote, en donde los mayores porcentajes de desinfección fueron obtenidos cuando se aplicó una doble desinfección y la utilización de carbón activado y ácido cítrico al medio.

A su vez, la utilización del alcohol (70%) depende más de un proceso integral o complejo de desinfecciones, el cual se inició con la utilización de este agente, ya que se comprobó que utilizándolo en conjunto con hipoclorito de sodio proporcionó un menor número de ápices contaminados, que cuando se aplicó sólo, esto debido a que este agente actúa disminuyendo la tensión superficial y permite de esta manera que la acción de los agentes desinfectantes como hipoclorito de sodio o de calcio sea mayor.

La utilización de benlate (agente fungicida) no mostró los resultados que se esperaban en la reducción de la contaminación fúngica, lo cual parece estar relacionado con la concentración y tiempo en que se utilizó este agente.

Con el uso de hipoclorito de calcio, los resultados obtenidos nos conducen a pensar en un efecto detrimental de la utilización de este agente. Se sabe que mucha de la acción de estos agentes depende de factores como temperatura, pH y dureza de su aplicación (Leifert *et al.* 1991), y posiblemente las concentraciones que se utilizaron fueron demasiado fuertes que ocasionaron un daño irreversible de los tejidos vegetales.

Para la contaminación bacterial dado que no se estaba utilizando ningún tipo de agente bactericida en el momento de la desinfección o directamente al medio, no se encontró diferencias de respuesta en cuanto al tipo de desinfección utilizada.

No obstante, el comportamiento de esta variable si varió con respecto al tiempo; llegando a constituirse en un obstáculo fuerte para la obtención de ápices sanos. Los resultados obtenidos en este ensayo parecen estar relacionados con condiciones ambientales favorables para el desarrollo de este tipo de agente, ya que las primeras desinfecciones se efectuaron en época de bajas precipitaciones y de alta temperatura, presentándose contaminación casi nula de *P. viridis*, por este agente. Estos resultados son similares a los encontrados por Roca (1996), por lo cual se recomienda trabajar en los meses de enero a mayo lo cual coincide con la época de abscisión de las hojas y el inicio de la nueva brotación., caracterizada por una reducción de látex dentro del tejido, alta concentración de reservas de los carbohidratos y una menor incidencias de plagas y enfermedades. A su vez, se ha encontrado que en especies como *Mangifera indica*, *Carica sp* y *Capsicum spp* existen variaciones estacionales que promueven que haya una mayor o menor incidencia de contaminación por este tipo de agentes (Ravindra y Thomas, 1997).

Otro de los problemas encontrados para el establecimiento de la técnica *in vitro*, es que a pesar de que muchos contaminantes se desarrollan rápidamente una vez que han sido sembrados los explantes, otros permanecen latentes(que no producen síntomas de la enfermedad en la planta o un crecimiento visible en el medio) después de que ellos han sido introducidos en cultivo (Leifert *et al.* 1992b). Pérdidas verdaderamente importantes han sido reportadas en cultivo de tejidos debido a la presencia de bacterias latentes (Boxus y Terzi,

1987; Cassels *et al*, 1987), ya que ellas pueden multiplicarse dentro del tejido de la planta y proveer una fuente de inoculo en la progenie derivada de vitroplantas.

Otro aspecto muy importante que se encontró durante la ejecución de estos ensayos fue la poca reactividad de los ápices de esta especie lo cual podría deberse a diferentes razones:

Pouteria sapota es una especie leñosa y aunque constantemente se incrementa la lista de especie que se pueden multiplicar eficientemente, tales técnicas no se han podido aplicar con los mismos resultados a las especies leñosas (Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991).

Factor juvenilidad: caracterizada por una baja reactividad en condiciones *in vivo*. Un principio básico según Bonga y Von Aderkas (1992) en el cultivo *in vitro* de especies arbóreas es que mientras más joven es el tejido y se encuentre en crecimiento activo, mejores resultados se obtendrán en el proceso de diferenciación de órganos.

La alta incidencia de infecciones no permitió evaluar la influencia de diferentes medios de cultivo y reguladores de crecimiento.

5.2.2 Microinjertos de *Pouteria sapota*.

La técnica de microinjerto para las condiciones desarrolladas no brindó resultados prometedores. Sin embargo, de los resultados obtenidos en otras especies como cacao (Aguilar *et al.*, 1992), y cítricos (Navarro *et al.* 1975) entre otros y la viabilidad inicial encontrada en esta investigación, puede ser una técnica útil en sapote.

De acuerdo a lo obtenido por Ojeda (1986) en ápices de *Cedrela odorata*, a pesar de las ventajas del microinjerto al aprovechar la estabilidad genética y características morfogénica de los ápices, al evitar los problemas asociados a juvenilidad y enraizamiento de tejidos adultos no ha podido aplicarse extensivamente a un rango amplio de especies, por las características peculiares de las diferentes especies.

Entre los factores más relevantes para el desarrollo exitoso de esta técnica (Aguilar, 1990) de manera que permita el establecimiento de una unión compatible entre el patrón y el injerto se encuentran: edad y estado del patrón; para cacao se obtuvo con plántulas de 3 y 4 semanas de edad con un buen eje vertical y un sistema de raíces secundarias en crecimiento activo. Además como se ha mencionado en cítricos (Murashige *et al.* 1972, Navarro *et al.*, 1975) y en rosáceas (Jornard, *et al.* 1983; Mosella y Ascui, 1984) la posición que ocupa el injerto entre el tejido del patrón, ya sea en contacto con la corteza o el tejido vascular es vital para que se establezca la unión. En cítricos (Murashige *et al.* 1972) y en especies del género *Malus* (Huang y Milikan, 1980) se ha encontrado que el tamaño del ápice-injerto influye en el éxito del microinjerto. Así mismo, la época del año en la cual se extraen los ápices que serán utilizados para el microinjerto, influencia el éxito del microinjerto. Por ejemplo en *Malus domestica* se ha encontrado que se produce un incremento de un 70% del prendimiento si los ápices-injerto se toman durante el mes de mayo, mientras que para los meses de noviembre a mayo decrece cerca de un 10%. Es además importante tomar en consideración el medio de cultivo que sería empleado en el establecimiento de dicha técnica.

6- CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos con la utilización de diferentes técnicas de propagación se concluye que:

Para la injertación de zapote, los mejores porcentajes de prendimiento fueron obtenidos cuando se utilizó la técnica de enchape lateral, lo cual hace de esta una alternativa viable para la propagación de genotipos de *Pouteria sapota*.

Cuando estas técnicas de injertación se ven complementadas con condiciones controladas de invernadero los resultados exitosos son mayores que si éstos se desarrollan en condiciones de campo.

La existencia de barreras físicas (banda de fibras) anterior al cambium vascular supone una dificultad para la propagación para esta especie.

Para efectos de encontrar genotipos adecuados para el enraizamiento se pudo llegar a determinar que el genotipo 10800-2 presenta potencialidades que puedan conducir a una técnica adecuada para propagación, ya que tanto en el ensayo 1 como en el ensayo 2 se obtuvo que éste es el genotipo que mejores resultados proporcionó para la turgencia y presencia de hojas, además que fue el único genotipo que enraizó.

La utilización del sustrato arena ha probado ser efectivo para empezar a desarrollar la técnica de enraizamiento de estacas, ya que los únicos resultados favorables de enraizamiento se presentaron en este sustrato.

La desinfección con hipoclorito de sodio (0,53 y 1,06) durante 10 minutos proporcionó los mejores resultados. Así mismo la utilización de ácido cítrico más carbón activado hizo posible la disminución del porcentaje de oxidación de los materiales.

Con los resultados obtenidos en el cultivo de ápices *in vitro*, se logró llegar determinar diferentes factores que influyen en el establecimiento de una metodología de desinfección útil para la propagación vegetativa a partir de ápices de *Pouteria sapota*.

Dada las condiciones de medio que se utilizaron se encontró que los porcentajes de reactividad fueron muy bajos para los ápices de la especie.

Es necesario el conocimiento de un conjunto de aspectos relacionados con la técnica de microinjertación propuesta: el ápice-injerto, los portainjertos y medios de cultivo para poder llevar a cabo esta técnica.

7 RECOMENDACIONES

Se recomienda para futuras investigaciones:

Efectuar estudios de los genotipos con los que se trabajará en la injertación, para así determinar aquellos con las características anatómicas y fisiológicas adecuadas, que permitan obtener un éxito en la injertación.

Seguir efectuando pruebas en cuanto a factores limitantes tanto exógenos como endógenos que puedan estar afectando el éxito en la técnica de injertación con patrones de tres meses de edad, en condiciones de invernadero y utilizando la técnica de enchape lateral, ya que a través de la ejecución de este ensayo se ha visto la viabilidad de poder trabajar con patrones de esta edad.

Continuar con el mejoramiento de la técnica de enraizamiento ya que esto ayudará hasta cierto grado, a reducir la pérdida de genotipos valiosos, al favorecer la propagación de un mayor número de genotipos. Esto es de vital importancia para la colección de sapotáceas del CATIE, que para el caso de esta especie se están perdiendo por efectos de enfermedades por hongos y bacterias.

Dar mantenimiento a la colección de campo, de manera que se pueda contar con un material de mejor calidad.

Continuar con estudios de propagación por estacas, probando concentraciones hormonales, tamaño de estacas y de segmento foliar, así como la posición de estacas.

Para el establecimiento de la técnica de propagación por estacas, se recomienda trabajar con estacas provenientes de plantas de vivero, y además, hacer cortes en la base de la estacas, de tal manera que se rompan las barreras físicas que impiden la salida de la raíz.

Continuar trabajando con el genotipo que mejores resultados proporcionó como es el 10800-2, ya que ha demostrado tener potencial para la aplicación de esta técnica.

Es necesario el conocimiento del estado fisiológico del árbol para efectuar la técnica de enraizamiento de estacas, ya que se observa que afecta significativamente este proceso.

Efectuar todo el conjunto de técnicas de propagación considerando el estado fenológico de los árboles a estudiar.

Continuar con la técnica de cultivo *in vitro* de ápices.

Efectuar ensayos utilizando la técnica de microestacas, y de esta manera ver la potencialidad de la utilización de esta técnica.

Seguir trabajando en el establecimiento de un protocolo de microinjertación.

Tomar en consideración la época seca para el establecimiento inicial de la técnica de cultivo *in vitro*.

Un apoyo de un programa de investigación en esta especie, de tal manera, que no existan solamente investigaciones aisladas, sino que sea parte de todo un programa de mejoramiento pero que sea específico para esta especie.

Manejo del material desde el invernadero para el desarrollo de la investigación.

Dado que es una especie recalcitrante, a la hora de efectuar una investigación se necesita contar con suficiente material vegetal para poder realizar los diferentes ensayos, por lo tanto, es necesario el conocimiento de los árboles donantes y de esta manera ver la disponibilidad del material con que se cuenta.

8- BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, A.J.; Whiteley, E. 1976. Culture of *Malus* tissues *in vitro*. In: I Multiplication of apple plants from isolated shoot apex. *Scientia Hort.* 4:183-189.
- Aguilar, M. 1990. Obtención de plantas de cacao (*Theobroma cacao*. L.) a partir del microinjerto de embriones somáticos. Tesis Mg. Sc. CATIE, Turrialba, C.R. 131 p.
- Almeyda, N.; Martín, F.W. 1976. Cultivation of neglected tropical fruits with promise. In: The mamey sapote. Part 2. Agricultural Research Service, U.S. Dept. of Agriculture. 13 p.
- Ahuja, M.R. 1993. Micropropagation of woody plants. Kluwer Academic Publishers. Forestry Sciences. Netherlands. 507 p.
- Azurdia, C.; Ayala, H.; Martínez, E. 1996. Recursos Genéticos. In: Distribución, variabilidad y riesgo de erosión genética de algunas sapotáceas en Guatemala. *Tikalía XIV* 1:83-107.
- Balerdi, C.F.; Campbell, C.W.; Crane, J.H. 1996. The mamey sapote. University of Florida. Cooperative Extension Service. Institute of Food and Agricultural Sciences. Horticultural Sciences Department. 8p.
- Ball, E. 1946. Development in sterile culture of stem tips and subjacent regions of *Tropaeolum majus* and *Lupinus albus* L. *Am. J. Bot.* 33:301-318.
- Biondi, S.; Thorpe, T.A. 1982. Clonal propagation of forest tree species. In: International Symposium on Tissue Culture of Economically Important Plants. Ed. por A.N. Rao. Singapore, Committee on Science and Technology in Developing Countries, Asian Network for Biological Sciences. Pp. 197-204.
- Bonga, J.M., Von Aderkas, P. 1992. *In vitro* culture of trees. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. Forestry Sciences 38:236.
- Boxus, P.H.; Terzi, J.M. 1987. Big losses due to bacterial contamination can be avoided in mass propagation sche. *Acta Horticulturae.* 212: 91-93.
- Campbell, C.W. 1967. The mamey sapote in Southern Florida. *Proc. Flor. State Hortic. Soc.* 80: 318-320.
- Campbell, C. W. 1970. Minor tropical fruit cultivars in Florida. *Proc. Flor. State Hortic. Soc.* 80:318-320.

- Campbell, C.W.; Lara, S.P. 1982. Mamey sapote cultivars in Florida. Proc. Fla. State Hort. Soc. 95: 114-115.
- Campbell, C.W.; Lara, S.P.; Ogden, M.A.H. 1980. Wild Dilly as a potential rootstock for sapodilla. Proc. Amer. Hort. Sci. Trop. Reg. 24:89-92.
- Campbell, C.W.; Lara, S.P.; Ogden, M.A.H. 1984. Grafting techniques for mamey sapote (*Calocarpum sapota*, Jacq Merr.) under Florida conditions. pp. 215-221
- Campbell, C.W.; Lara, S.P.; Ogden, M.A.H. 1984. Removal of apical dominance in rootstocks to enhance grafting success in mamey sapote (*Calocarpum sapota* Jacq Merr). Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. Trop. Reg. 28:79-81.
- Cassells, A.C.; Carney, B.F. 1987. Adventitious regeneration in *Pelargonium x domesticum* Bailey. Acta Horticulturae. 212:419-423.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. In: Micropropagación: conceptos, metodología y resultados Ed. por Thorpe, T.A.; Villalobos, V.M.; Roca, W.M.; Mroginski, L.A. Cali, Colombia. pp. 127-142.
- Christiansen, J.; Fonnesbech, M. 1975. Prevention by polyninylpyrrolidone of growth inhibition of *Hamamelis* shoot tips in *in vitro* and of browning of the agar medium. Acta Horticulturae. 54:101-104.
- Constantine, D. R. 1986. Micropropagation in the commercial environment. In: Plant tissue culture and its agricultural applications. Ed. por Withers, L.A.; Alderson, P.G. Butterworths, London, pp.175-186.
- Driver, J.A.; Kuniyuki, A.H. 1984. *In vitro* propagation of *Paradox* walnut rootstock. Hort Science 19: 507-509.
- Ebert, A.; Taylor, H.F. 1990. Assessment of changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrating in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. Plant Cell Tissue Culture. 20:165-172.
- Flores, E.M. 1994. La Planta: estructura y función. 2ª. Edición. Cartago. Editorial tecnológica de C. R. 501 pp.
- Granados, J.C. 1992. Efecto de reguladores del crecimiento en la injertación de zapote (*Calocarpum sapota*.). Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort. 36: 40-42.
- Gay, A. P.; Loach, K. 1977. Leaf conductance changes in leafy cuttings of *Cornus* and *Rhododendron* during propagation. Journal of Horticultural Science 52: 509-516.

- Gebhardt, K.; Goldbach, H. 1988 . Establishment, graft union characteristics and growth of *Prunus* micrografts. *Physiol. Plant.* 72:153-159.
- George, E.F.; Sherrington, P.D. 1984. Plant propagation by tissue culture. Eversley, G.B., Exegetics. 709 p.
- Guardián, R.J., Rodríguez, A.E. 1985. Pruebas de injertación en zapote (*Calocarpum sapota* Jacq Merr). Universidad de Costa Rica. pp. 121-134.
- Guevara, H. U. 1977. Pruebas de propagación vegetativa en seis especies frutales de interés en Costa Rica. Tesis Universidad de Costa Rica, Facultad de Agronomía, Escuela de Fitotecnia. 82p.
- Gonzáles, L.G., Favella, R.L. 1952. Inter-generic graft affinity of the chico. *Philip.Agr.* 35:402-409.
- Grange, I.R.; Loach, K. 1983. Environmental factors affecting water lost from leafy cuttings in different propagation systems. *Journal of Horticultural Science (Inglaterra).* 58(1):1-7.
- Haissig, E.B. 1974b. Origin of adventitious roots. *New Zealand Journal of Forestry Science (Nueva Zelanda).* 4(2): 299-310.
- Haissig, E.B. 1986. Metabolic processes in adventitious rooting of cuttings. Ed. por Jackson, M.B. In: *New root formation in plants and cuttings.* Netherlands, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 141-180.
- Harms, C.T.; Baktir, I. Oertli, J.J. 1983. Clonal propagation *in vitro* of red beet (*Beta vulgaris* spp.) by multiple adventitious shoot formation. *Plant Tissue Organ Culture.* 2: 93-102.
- Hartman, H.T.; Kester, D.E.; Davis, F.T, Jr. 1990. *Plant Propagation. Principles and practices.* Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs .Fifth edition. New Jersey. 647 p.
- Henry, P.H., Blazich, F.A., Hinesley, L.E. 1992. Vegetative propagation of eastern red cedar by cuttings. *Hort Science* 27:1272-1274.
- Herrero, J. 1951. Studies of compatible and incompatible graft-combinations with special reference to hardy fruit trees. *J. Hortic. Sci.* 26: 186-237.
- Hildebrandt, V.; Harney, P.M. 1988. Factors affecting the release of phenolic exudate from explants of *Pelargonium x hortorum*, Bailey "Sprinter Scarlet". *Journal of Horticultural Science.* 63: 651-657.

- Holdridge, L.R. 1987. Ecología basada en zonas de vida. San José, C. R. IICA. 216 p.
- Holland, M.A.; Polacco, J.C. 1994. PPFMs and others contaminants: Is there more to plant than just plant? *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 45: 197-209.
- Jackson, M.B. 1986. New root formation in plants and cuttings. Ed. por Peterson, R.L.; Peterson, P. A. In: Ontogeny and anatomy of lateral root. Development in Plant and Soil Sciences. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp. 1-30.
- Jonard, R.; Hugard, J.; Macheix, J.; Martínez, J.; Mosella-Chancel, L.; Poesel, J.L.; Villemur, P. 1983. *In vitro* micrografting and its applications to fruit science. *Scientia Hort.* 20:147-159.
- Jones, O.F.; Vine, S.J. 1968. The culture of gooseberry shoot tips for eliminating virus. *J. Hortic. Sci.* 43:289-292.
- Lazo, F.R. 1965. Grafting of the mamey sapote. *Arroz* 14:148.
- Lecort, M.; Van Den Heede. 1989. El estaquillado. Guía práctica de multiplicación de las plantas. Artes gráfico palermo, Palermo, Madrid. 197 p.
- León, J. 1968. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A. San José, C. R. pp. 246-247.
- Leakey, R.R.B.; Chapman, V.R.; Longman, K.A. 1982. Physiological studies for tree improvement and conservation. Some factors affecting root initiation in cuttings of *Triplochiton scleroxylon* K. Schum. *Forest Ecology and Management.* 4:53-66.
- Leakey, R.R.B. 1983. Stockplant factors affecting root initiation in cuttings of *Triplochiton scleroxylon* K. Schum., and indigenous hardwood of West Africa. *Journal of Horticultural Science (Inglaterra).* 58(2): 277-290.
- Leakey, R.R.B. 1987. Clonal forestry in the tropics a review of development strategies and opportunities. *Commonwealth Forestry Review (G.B.)* 66:61-75.
- Leakey, R.R.B.; Coutts, P.M. 1989. The dynamics of rooting in *Triplochiton scleroxylon* cuttings: their relation to leaf area, node position, dry weight accumulation, leaf water and carbohydrate composition. *Tree Physiology (Canadá)* 5:135-146.
- Leakey, R.R.B.; Mesén, F. 1993. Propagación vegetativa de especies forestales: enraizamiento de estacas suculentas. Ed. por Cornelius, J.P.; Mesén F.; Corea E. In: Manual sobre mejoramiento genético con referencia especial a América Central. CATIE, Turrialba, C. R. 10:147-167.

- Leakey, R.R.B.; Mesén, F.; Tchoundjeu, Z.; Longman, K.A.; Dick, J.Mc.P.; Newton, A.; Matín, A.; Grace, J.; Munro, R.C.; Mutoka, P.N. 1990. Low-technology techniques for the vegetative propagation of tropical trees. *Commonwealth Forestry Review (G.B.)* 69(3):247-257.
- Leakey, R.R.B.; Newton, A.C.; Dick, J.Mc.P. 1994. Capture of genetic variation by vegetative propagation: processes determining success. Ed. por Leakey, R.R.B., Newton, A.C. In: *Tropical trees: the potential for the domestication and the rebuilding of forest resources*. AMSO, London, pp. 72-83.
- Leung, Woot-Tsuen Wu. 1961. Tabla de composición de alimentos para uso en América Latina. Guatemala, Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. 132 p.
- Leifert, C.; Camotta, H.; Wright, S.M.; Waites, B.; Chayne, V.A.; Waites, W.M. 1991b. Elimination of *Lactobacillus plantarum*, *Corynebacterium* spp, *Staphylococcus saorophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated *Hemerocallis*, *Choisya* and *Delphinium* cultures using antibiotics. *Journal of Applied Bacteriology*. 71:452-469.
- Libby, W.J., Rauter, R.M. 1984. Advantages of clonal forestry. *The forestry chronicle*. pp. 145-149.
- Loach, K. 1988. Controlling environmental condition to improve adventitious rooting. Ed. por Davis T.D., Haissig, B.E. y Sankhla, N. In: *New Root Formation in Plants and Cuttings*. Dordrecht, Países Bajos, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 111-140.
- Longman, K.A. 1993. Rooting cuttings of tropical trees. *Tropical trees: Propagation and Planting Manuals*, Commonwealth Science Council. 1:137 p.
- Malo, S.E. 1970. A review of important cultivars of fruits for the tropics. In: *Minor tropical fruit cultivars in Florida*. Ed. por Campbell, C.W. Subtropical Experiment Station, IFAS, University of Florida Homestead, Florida. Florida State Horticultural Society "Krome Memorial Section", Proceeding, Volume 83. p. 355-356.
- Malo, S.E. 1970. Propagation of the mamey sapote. *Proc. Trop. Reg. Am. Soc. Hort. Sci.* 18:165-174.
- Martínez T, E.A., Utrera G, L.F. 1994. Recursos Fitogenéticos. In: *Caracterización "in situ" de zapote (*Pouteria sapota* Jacq Moore Stearm) en chiquimulilla y Guazacapan*. Santa Rosa, Guatemala. *Tikalía XII* 2:35-51.
- Mesén, F. 1993. Vegetative propagation of Central American hardwoods. Thesis Ph.D. Edinburgh, Scotland, University of Edinburgh, Institute of Terrestrial Ecology. 231 p.

- Mesén, F. 1997. Propagación vegetativa del San Juan (*Vochysia guatemalensis* Donn. Smith) mediante enraizamiento de estacas juveniles. Revista Forestal Centroamericana. Año 6. 21: 19-24.
- Moore Jr, H.E.; Stearn, T. W. 1967. The identity of *Achras zapota* L. and the names for the sapodillas and the sapote. Taxon 16:382-395.
- Mora, E. 1990. Estudio histológico del microinjerto de embriones cigóticos y somáticos de café (*Coffea* spp.). Tesis Mg. Sc. CATIE. Turrialba, C. R. 72 p.
- Morera, J. A. 1992. El Zapote. CATIE. Programa de Capacitación. Turrialba, C. R. Serie Técnica. Informe Técnico No. 93. 20 p.
- Morton, J.F. 1987. Fruits of warm climates. Media Incorporate. Miami, Fl. pp. 393-416.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:53-58.
- Navarro, J.L.; Roistacher, C.N.; Murashige, T. 1975. Improvement of shoot tip grafting in vitro for virus-free *Citrus*. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 100:471-479.
- Navarro, L.; Juárez, J. 1977. Elimination of citrus pathogens in propagative budwood. In: II: *In vitro* propagation. Proc. Int. Soc. Citriculture 3:973-978.
- Navarro, L.; Llager, G.; Cambra, M.; Arregui, J.M.; Juárez, J. 1982. Shoot-tip grafting *in vitro* for elimination of viruses in peach plants (*Prunus persica* Batsch), Acta horticulturae.
- Newton, A.C.; Muthoka, P.; Dick, J, Mc.P. 1992. The influence of leaf area on the physiology and rooting of leafy stem cuttings of *Terminalia spinosa*. Trees. 6: 210-215
- Núñez, B.Y. 1997. Propagación vegetativa del Cristóbal (*Platymiscium pinnatum*, BENTH), Pílon (*Hyeronima alchorneoides*, ALLEMO) y Surá (*Terminalia oblonga*, RUÍZ&PAVON), mediante el enraizamiento de estacas juveniles. Tesis Mag. Sc. Turrialba, C. R., CATIE. 150 p.
- Odgen, M.A.H. 1984. Factors affecting the graft union of mamey sapote (*Callocarpum sapota* Jacq Merr.) Ph. D. Thesis., Univ. of Florida, Gainesville. 125 p.
- Ojeda, L. 1986. Microinjerto in vitro de *Cedrela odorata* L. empleando ápices juveniles y adultos. Tesis Mag. Sc. Chapingo, México. Colegio de Posgraduados. 65 p.

- Palzkill, D.A., Feldman, W.R. 1993. Optimizing rooting of jojoba stem cuttings: effects of basal wounding, rooting medium and depth of insertion in medium. *Journal of American Oil Chemist Society*. 70:1221-1225.
- Pierik, R.L.M. 1990. Rejuvenation and micropropagation. In: *Progress in plant cellular and molecular biology*. Ed. por Nijkamp, J.; Van der Plas, L.; Van Aartrik, J. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 91-101.
- Popenoe, W. 1939. *Manual of tropical and subtropical fruits*. Hafner Press. MacMillan Publishing Co., New York. pp. 340-343.
- Pennington, T. D. 1990. Sapotaceae. *The New York Botanical Garden, Bronx, New York. Flora Neotrópica* 52: 1-11.
- Rawson, H.M.; Begg, J.E.; Woodward, R.G. 1977. The effect of atmospheric humidity on photosynthesis, transpiration and water use efficiency of leaves of several plant species. *La Planta*. 134: 5-10.
- Quak, F. 1977. Meristem culture and virus free plants. Ed. por Reinert, J., Bajaj, Y.P.S. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer Verlag, Heidelberg. pp. 598-646.
- Rao, A.N.; Lee, S.K. 1982. Importance of tissue culture in propagation. In: *International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*. Ed. por Fujiwara, A. Proceedings. Tokyo, Japan, Japanese Association for Plant Tissue Culture. pp. 715-718.
- Rao, A.N. 1986. *In vitro* studies on trees of humid tropics. In: *International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Abstracts*. Minneapolis, University of Minnesota. International Association for Plant Tissue Culture. pp.14.
- Ravindra, M.B.; Thomas, P. 1997. Shoot tip culture in mango: Influences of medium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments on phenolic exudatio, explant survival and axenic culture establishment. *Journal of Horticultural Science*. 72(5):713-722.
- Roca, E. 1996. Respuesta de las puntas terminales de zapote (*Pouteria sapota*. L cronquist) al cultivo *in vitro* utilizando dos medios basales de cultivo y tres diferentes tipos de reguladores del crecimiento en diferentes concentraciones. Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos. Guatemala. pp. 84-95 .
- Roistacher, C.N. 1977. Elimination of citrus pathogens in propagative budwood. In: *Budwood selection indexing and thermotherapy*. Proceedings of the International Society of Citriculture, 3:965-972.
- Rojas, G.M. 1972. *Fisiología vegetal aplicada*. México. McGraw Hill pp. 39-40; 172-173.

- Stein, K.M. 1988. *In vitro* culture of the peñibaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.) Master of Science thesis, Iowa State University, Ames, Iowa. pp. 34-47, 103-119, 147-149.
- Tabachnik, L.; Kester, D. 1977. Shoot culture for almond and almond-peach hybrid clones *in vitro*, HortScience. 12: 545-547.
- Umaña, C. 1997. Injertación del zapote (*Pouteria sapota* Jacq. Merr.) Programa Agricultura Tropical Sostenible. CATIE, Turrialba, C. R. 18 p.
- Veierskov, B. 1988. Relations between carbohydrates and adventitious root formation. Ed. por Davis, D. T; Haissing, E.B.; Sankhla, N. In: Adventitious root formation in cuttings. Oregon, Dioscorides Press. pp. 70-78.
- Walkey, D.G. 1972. Production of apple plantlets from axillary bud meristems. Can. J. Plant Sci. 52: 1085-1087.
- Wells, J.S. 1962. Wounding cuttings as a commercial practice. Combined Proceedings of the International Plant Propagators' society. 12:47-55.
- Wilson, P.J. 1994. The concept of limiting rooting morphogen in woody stem cuttings. Journal of Horticultural Science. 69(4): 591-600.
- Zimmerman, R.H. 1981. Micropropagation of fruit plants. Acta Horticulturae. 120: 217-222.
- Zimmerman, R.H. 1983. Methods in fruit breeding. In: Tissue Culture. Ed. por Moore, J.N.; Janick, J. Purdue University Press. West Lafayette, Indiana. pp.124-135 .
- Zobel, B., Talbert, J. 1992. Técnicas de mejoramiento genético en árboles forestales. Trad. Manuel Guzmán Ortíz, Editorial Limusa. 545 p.

9- ANEXOS

Anexo 1: Características de manny sapote y disponibilidad de cada cultivar para la producción comercial.

Cultivar	Fuente	Época de maduración	Tamaño de fruta(g/oz)	Color Pulpa	Sabor	Tamaño árbol/habito ⁴	Rendimiento	Tolerancia al frío	Preocidad
Copan	TREC	Julio-Agosto	425-960/15-32	Roja	Excelente	medio/	Alto	Si	No
Megaha	TREC	Abril-mayo	740-2400/26-85	Rosada	Buena	pequeño/	Alto	No	Si(*)
Mayanpan	TREC	Julio-Agosto	510-1135/26-85	Roja	Buena	alto/	Alto	Si	No
Tazumal ¹	TREC	Enero-febrero	400-850/14-30	Rosada	Pobre-buena	medio	Alto	Si	Si
AREC No.3 ¹	TREC	Julio-Septiembre	400-740/14-26	Roja	Excelente	medio	Medio	Desconocido	Desconocido
Pantín (Key West)	Pantín	Julio-agosto	400-1130/14-40	Rojo-rosada	Excelente	alto	Medio	Si	No
Piloto	Lara	Agosto-septiembre	400-740/14-26	Rojo-rosada	Excelente	Medio	Medio	No	No
Pace	Lara	marzo-abril	425-900/15-32	Salmon	Excelente	Alto	Alto	Si	Si(*)
Florida	Lara	marzo-abril	400-1130/14-40	Rojo-rosada	Buena	Alto	Alto	No	No
Lara	Lara	agosto-septiembre	400-1130/14-40	Rojo	Excelente(*)	Desconocido	Desconocido	Si(*)	Desconocido
Cienox	Zill	mayo-junio	400-850/14-30	Rosado	Buena	Medio	Medio	Desconocido	Desconocido
Abuelo	Acosta	octubre-noviembre	740-2400/26-85	Rojo profundo	Excelente	Spreading	Medio	Desconocido	Desconocido
Francisco	Lessar y Lara	agosto-septiembre	560-700/20-25	Rojo-rosado	Excelente	Upright	Medio	No	Desconocido
Fernandez									
Flores	Economou	noviembre-diciembre	740-2400/26-85	rojo	Excelente	Upright	Desconocido	Desconocido	Desconocido
Viejo	Martinez	diciembre	400-560/16-20	Rojo profundo	Excelente	Spreading	Desconocido	Si	Si(*)

¹TREC, Tropical Research and Education Center, Pantín, Don Pantín; Lara, Pablo Lara; Zill, Lawrence Zill; Lessard, Bill Lessard; Acosta, Benvenuto Acosta; Lessard & Lara, William Lessard y Pablo Lara; Economou; Martinez, Ramon Martinez

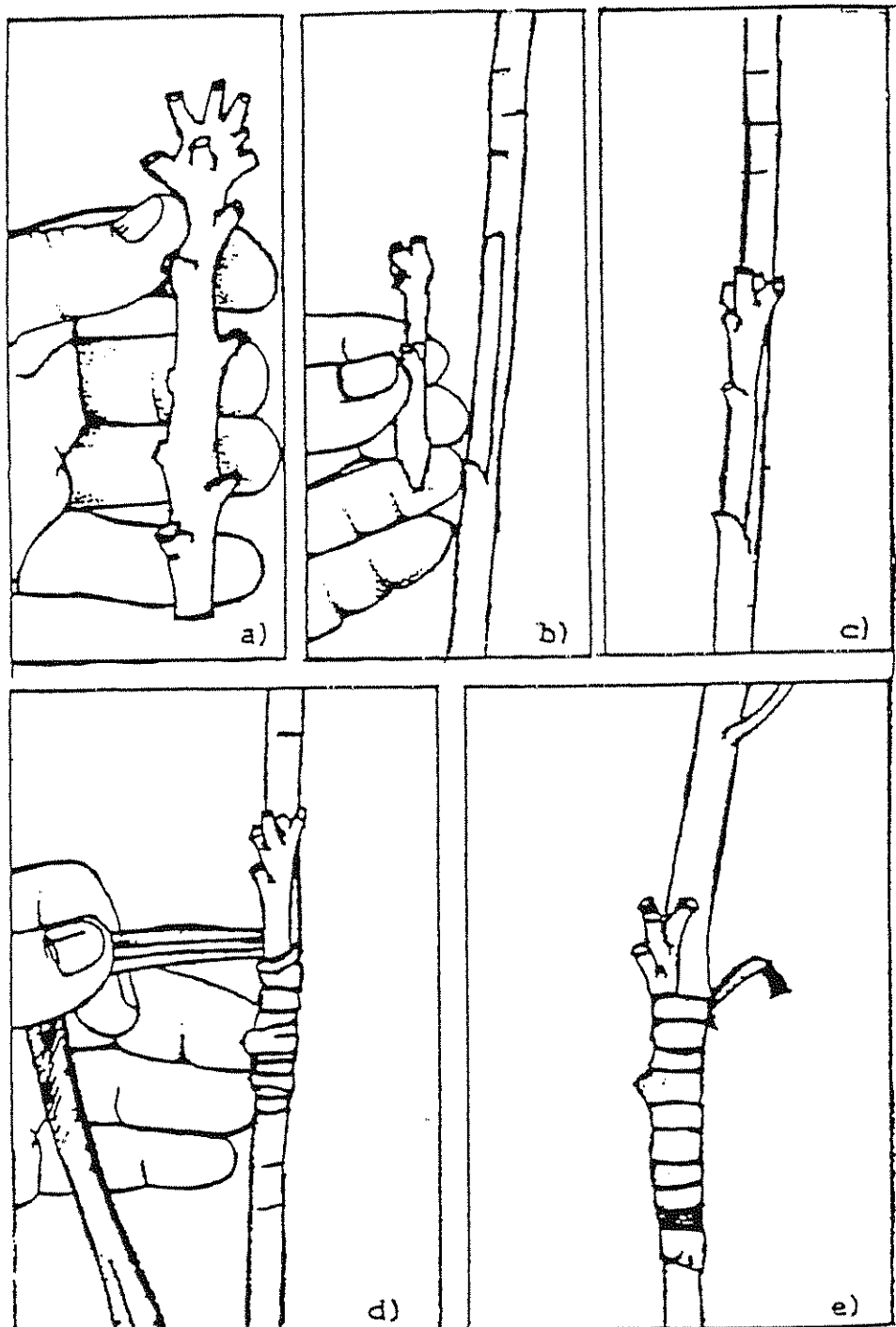
²1-2 semillas por fruta

³3-4 semillas por fruta

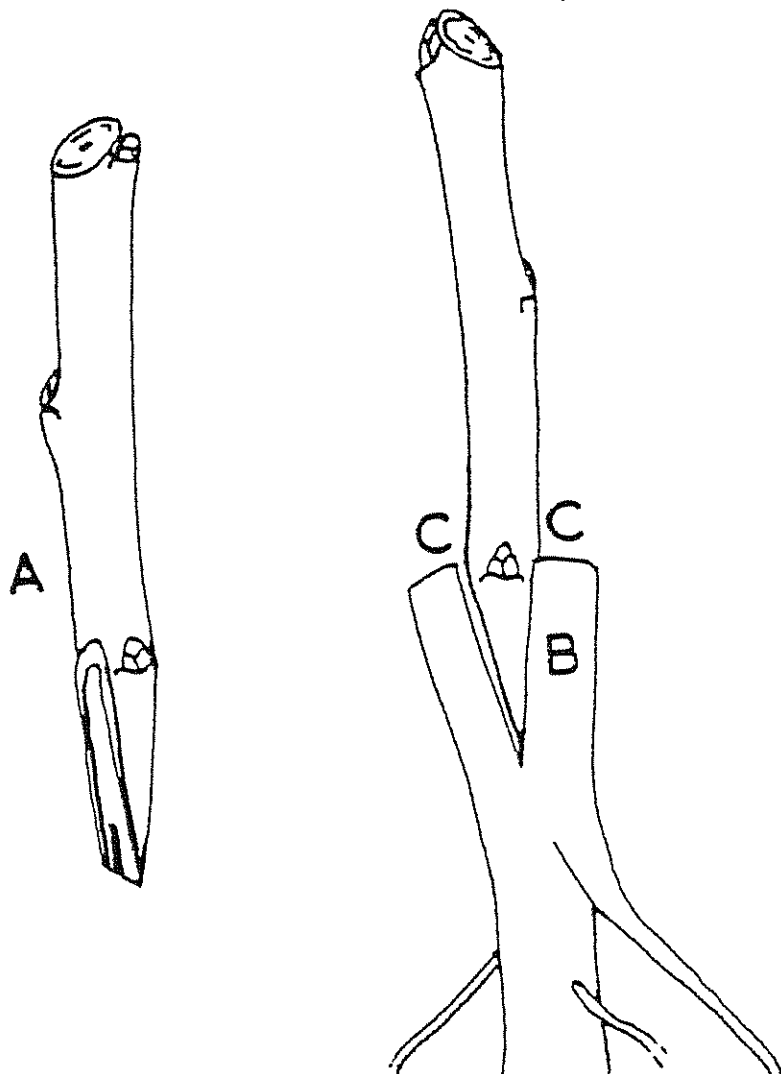
⁴Observaciones en muchos cultivares no han sido completadas

* Enfatizada

Anexo 2: Injerto de enchape lateral a) Vareta antes de ser cortada; b) preparación de la vareta; c) vareta en injerto; d) envoltura con cinta; e) injerto completo y amarrado. (Tomado de "El zapote". Morera, J.A. 1985).



Anexo 3 Injerto de púa. A) Vareta (púa) antes de ser injertada; B) Patrón sobre el cual se injertará; C) Acoplamiento del patrón y del injerto. (Tomado de "The propagation of tropical fruit trees"; CAB, 1988).



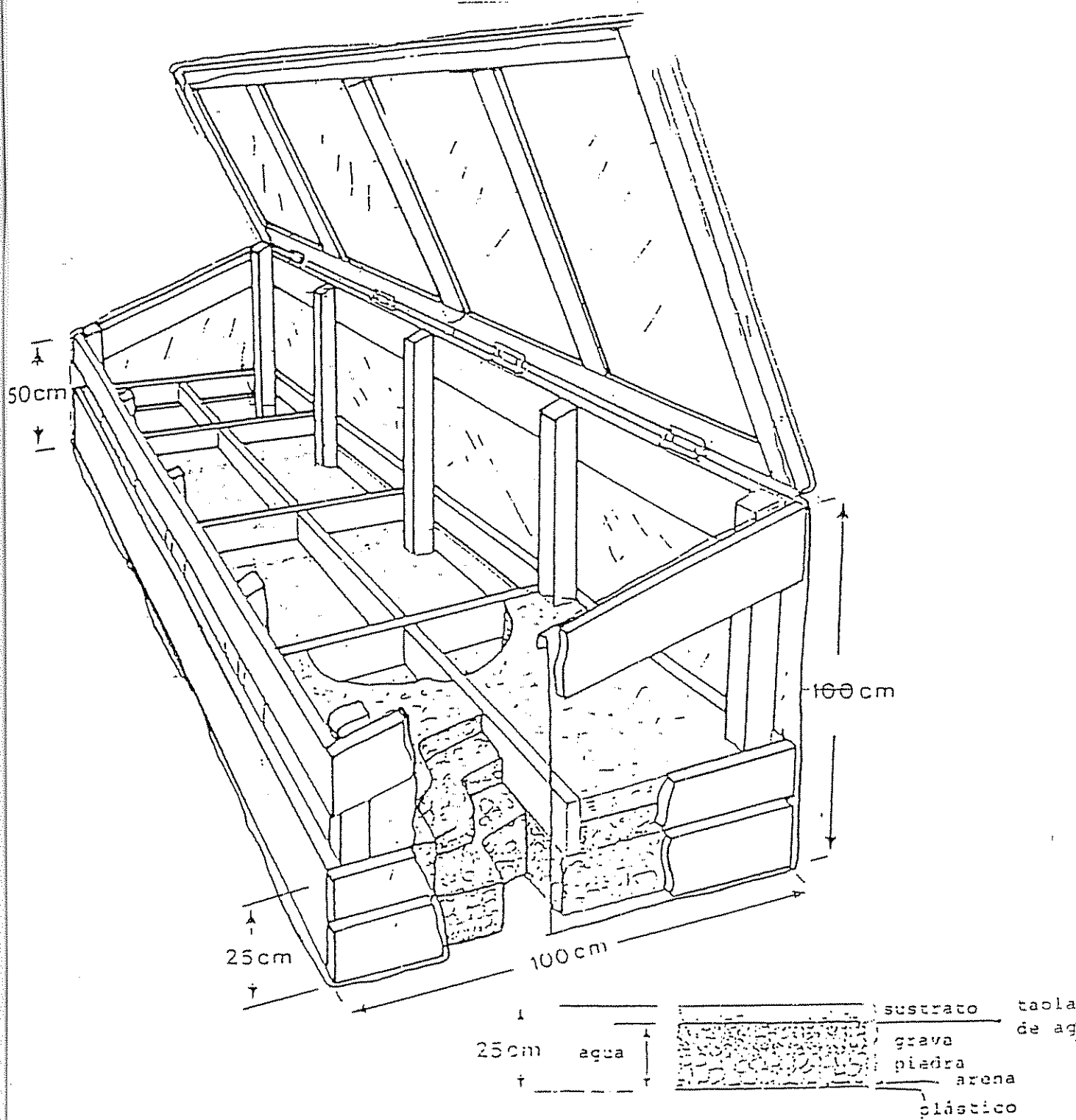
Anexo 4 Programa de aplicaciones química al suelo y foliar.

LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES
Aplicación de plaguicidas		Aplicación de plaguicidas		Aplicación de plaguicidas
Benomyl y Agrymicin		Benomyl y Agrymicin		Benomyl y Agrymicin

Nota: Una vez por mes fertilización al suelo.

Una vez por semana fertilización foliar.

Anexo 5: Propagador de subirrigación.



Anexo 6: Condiciones ambientales promedio dentro de los propagadores, Turrialba, Costa Rica, marzo 1997, Nuñez, 1997).

Condición	Promedio	Rango
Humedad Relativa(%)	97.92	92.37 – 100
Temperatura del aire(°C)	22.01	19.59 – 24.37
Temperatura sustrato (°C)	24.36	22.25 – 27.05
Radiación solar ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$)	42.65	5.6 - 208.6

Anexo 7. Composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS)

Componentes	Cantidad mg. l ⁻¹
<u>Macroelementos</u>	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Na ₂ EDTA	37,3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	37,3
<u>Microelementos</u>	
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	8,6
KI	0,83
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
<u>Compuestos orgánicos</u>	
Inositol	100
Ácido nicotínico	0,5
Piridoxina-HCl	0,5
Tiamina-HCl	0,1
Glicina	2
Sacarosa	30,000
<u>Gelificante</u>	
Agar	0.7%
PH	5,7-5,8

Anexo 8 Protocolo de deshidratación, infiltración y tinción empleado para el estudio histológico de estacas y de microinjertos.

Proceso	Concentración	Tiempo
Fijación		
FAA	10:7:2:1	48 horas
Deshidratación		
Etanol	50%	1 hora
Etanol	70%	1 hora
Etanol	80%	1 hora
Etanol	85%	1 hora
Etanol	90%	1 hora
Etanol	95%	1 hora
Etanol	100%	1 hora
Etanol	100%	1 hora
Infiltración		
Resina	100 cc de resina (Technovit 7100 Kulser) 1 gramo de activador	12 horas a 4°C
Formación de bloques	15 ml de medio de infiltración 10 ml endurecedor	
Tinción		
Dinitrofenil	0,33%	15 minutos
Agua destilada	-	varios enjuagues
Ácido Periódico	1%	10 minutos
Agua corriente	-	varios enjuagues
Shift	-	20 minutos
Naftol	1%	4 minutos
Ácido acético	7%	1 minuto
Acido acético	7%	1 minuto

Anexo 9 Análisis estadístico utilizado en la propagación vegetativa de sapote *Pouteria sapota*

Para las diferentes variables que se utilizaron en el ensayo de enraizamiento de estacas el modelo de análisis de varianza que se siguió fue el que se detalla a continuación:

$$Y_{ijklm} = \mu + E_i + G_j + GS_{ij} + \lambda_{ijk} + S_l + ES_{il} + GS_{jl} + E_{ijklm}$$

Donde:

Y_{ijklm} = Variable aleatoria de respuesta.

μ = Media general

E_i = Efecto del i-ésimo sustrato.

G_j = Efecto del j-ésimo genotipo

GS_{ij} = Efecto de la interacción del i-ésimo sustrato en el j-ésimo genotipo.

λ_{ijk} = Error experimental parcela grande.

S_l = Efecto de la l-ésima fecha de medición.

ES_{il} = Interacción del i-ésimo tratamiento con la l-ésima fecha de medición.

GS_{jl} = Interacción del j-ésimo tratamiento con la l-ésima fecha de medición.

E_{ijklm} = Error de subparcela

Para las variables sobrevivencia y longitud, el modelo de análisis de varianza se detalla a continuación:

$$Y_{ijklm} = \mu + I_i + G_j + C_k + IG_{ij} + IC_{ik} + GC_{jk} + IGC_{ijk} + \lambda_{ijkl} + S_m + IS_{mi} + GS_{jm} + CS_{km} + IGS_{ijm} + ICS_{ikm} + GCS_{jkm} + IGCS_{ijkm} + E_{ijklm}$$

Donde:

Y_{ijklm} = Variable aleatoria de respuesta.

μ = Media general

I_i = Efecto de la i-ésima técnica de injertación

G_j = Efecto del j-ésimo genotipo

C_k = Efecto de la k-ésima condición

$IG_{ij}, IG_{ij}, IC_{ik}, GC_{jk}, IGC_{ijk}, S_m, IS_{mi}, GS_{jm}, CS_{km}, IGS_{ijm}, ICS_{ikm}, GCS_{jkm}, IGCS_{ijkm} =$

Efectos de la interacción de los i-ésimo, j-ésimo, k-ésimo y m-ésimos

λ_{ijkl} = Error de la parcela grande

E_{ijklm} = Error de subparcela (fecha de medición)

Para la micropropagación el modelo de análisis de varianza utilizado en las diferentes variables en cada uno de los experimentos que se efectuaron se detalla así:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + \lambda_{ij} + S_k + TS_{ik} + E_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijkl} = Variable aleatoria de respuesta.

μ = Media general

E_i = Efecto del i -ésimo tratamiento (desinfección o agente antioxidante)

λ_{ij} = Error experimental parcela grande.

S_k = Efecto de la k -ésima fecha de medición.

TS_{ik} = Interacción del i -ésimo tratamiento con la k -ésima fecha de medición.

E_{ijkl} = Error de subparcela

Para los modelos anteriores se tendrá que hacer la prueba de supuestos del modelo que se detallan a continuación:

Supuesto de normalidad: Prueba de Shapiro-Wilk

|||Supuesto de homogeneidad. Prueba de Bartlett

Supuesto de $\sum \mu = 0$: Prueba T.

Anexo 10 Diferencia mínima significativa para la variable longitud para la semana once, CATIE, 1998.

F. V.	LONG ITUD	
	Promedio	Rangos
Se ₁₁ C ₁ G ₁	5,18	AB
Se ₁₁ C ₁ G ₂	5,57	A
Se ₁₁ C ₁ G ₃	4,50	B
Se ₁₁ C ₂ G ₁	2,79	B
Se ₁₁ C ₂ G ₂	3,08	B
Se ₁₁ C ₂ G ₃	5,40	A
Se ₁₁ C ₁ G ₁	5,18	A
Se ₁₁ C ₂ G ₁	2.79	B
Se ₁₁ C ₁ G ₂	5,57	A
Se ₁₁ C ₂ G ₂	3.08	B
Se ₁₁ C ₁ G ₃	4,50	A
Se ₁₁ C ₂ G ₃	5,40	A

Anexo 11 Diferencia mínima significativa para la variable sobrevivencia para la semana once. CATIE, 1998.

F. V.	SOBRE VIVENCIA	
	Promedio	Rangos
Se ₁₁ I ₁ G ₁	0,25	B
Se ₁₁ I ₁ G ₂	0,35	A
Se ₁₁ I ₁ G ₃	0,15	B
Se ₁₁ I ₂ G ₁	0,65	A
Se ₁₁ I ₂ G ₂	0,30	B
Se ₁₁ I ₂ G ₃	0,55	A
Se ₁₁ I ₁ G ₁	0,25	B
Se ₁₁ I ₂ G ₁	0,65	A
Se ₁₁ I ₁ G ₂	0,35	A
Se ₁₁ I ₂ G ₂	0,30	A
Se ₁₁ I ₁ G ₃	0,15	B
Se ₁₁ I ₂ G ₃	0,55	A

Anexo 12 Diferencia mínima significativa para la variable sobrevivencia para la semana once. CATIE, 1998.

F. V.	SOBRE VIVENCIA	
	Promedio	Rangos
Se ₁₁ I ₁ C ₁	0,40	A
Se ₁₁ I ₁ C ₂	0,10	B
Se ₁₁ I ₂ C ₁	0,50	A
Se ₁₁ I ₂ C ₂	0,50	A
Se ₁₁ I ₁ C ₁	0,40	A
Se ₁₁ I ₂ C ₁	0,50	A
Se ₁₁ I ₁ C ₂	0,10	B
Se ₁₁ I ₂ C ₂	0,50	A

Anexo 13 Diferencia mínima significativa para las variables porcentaje de prendimiento. CATIE, 1998.

F. V.	PORCENTAJE DE PRENDIMIENTO	
	Promedio	Rangos
I ₁	25	B
I ₂	50	A

Anexo 14 Diferencia mínima significativa para las variables turgencia y desarrollo de brote. CATIE, 1998.

F. V.	TURGENCIA		DESARROLLO DE BROTE	
	Promedio	Rangos	Promedio	Rangos
S ₁ G ₁	0,86	A	0,36	AB
S ₁ G ₂	0,36	BC	0,35	AB
S ₁ G ₃	0,10	D	0,00	C
S ₁ G ₄	0,20	CD	0,20	BC
S ₁ G ₅	0,50	B	0,50	A
S ₁ G ₆	0,07	E	0,00	C
S ₂ G ₁	0,81	A	0,48	A
S ₂ G ₂	0,22	B	0,22	B
S ₂ G ₃	0,00	C	0,00	C
S ₂ G ₄	0,22	BC	0,11	BC
S ₂ G ₅	0,00	C	0,00	C
S ₂ G ₆	0,06	BC	0,06	BC

Anexo 15 Diferencia mínima significativa para las variables desarrollo de callos y presencia de hojas. CATIE, 1998.

F. V.	DESARROLLO DE CALLOS		PRESENCIA DE HOJAS	
	Promedio	Rangos	Promedio	Rangos
S ₁ G ₁	0,55	A	0,89	A
S ₂ G ₁	0,43	B	0,80	B
S ₁ G ₂	0,28	A	0,24	A
S ₂ G ₂	0,19	B	0,25	A
S ₁ G ₃	0,02	A	0,17	A
S ₂ G ₃	0,07	A	0,17	A
S ₁ G ₄	0,02	B	0,24	A
S ₂ G ₄	0,25	A	0,30	A
S ₁ G ₅	0,43	A	0,55	A
S ₂ G ₅	0,00	B	0,08	B
S ₁ G ₆	0,07	A	0,10	A
S ₂ G ₆	0,07	A	0,10	A

Anexo 16 Diferencia mínima significativa para las variables desarrollo de callos y presencia de hojas para la semana dieciséis. CATIE, 1998.

F. V.	PRESENCIA DE HOJAS		DESARROLLO DE CALLO	
	Promedio	Rangos	Promedio	Rangos
Se ₈ G ₁	0,79	A	0,77	A
Se ₈ G ₂	0,09	C	0,30	B
Se ₈ G ₃	0,05	C	0,00	DE
Se ₈ G ₄	0,10	BC	0,16	CD
Se ₈ G ₅	0,25	B	0,25	BC
Se ₈ G ₆	0,06	C	0,06	CDE

Anexo 17 Diferencia mínima significativa para las variables desarrollo de callos y presencia de hojas para las últimas tres semanas de evaluación, ensayo de enraizamiento 2. CATIE, 1998.

F. V.	DESARROLLO DE CALLOS		PRESENCIA DE HOJAS	
	Promedio	Rangos	Promedio	Rangos
Se ₆ S ₁	0,39	A	0,32	A
Se ₆ S ₂	0,26	B	0,22	B
Se ₇ S ₁	0,39	A	0,28	A
Se ₇ S ₂	0,26	B	0,21	A
Se ₈ S ₁	0,38	A	0,28	A
Se ₈ S ₂	0,26	B	0,21	A

Anexo 18 Diferencia mínima significativa para las variable presencia de hojas para las últimas tres semanas de evaluación, ensayo de enraizamiento 2. CATIE, 1998.

F. V.	PRESENCIA DE HOJAS	
	Promedio	Rangos
Se ₆ S ₁	0,05	A
Se ₆ S ₂	0,09	A
Se ₇ S ₁	0,05	A
Se ₇ S ₂	0,09	A
Se ₈ S ₁	0,05	A
Se ₈ S ₂	0,09	A

Anexo 19 Diferencia mínima significativa para las variables turgencia y desarrollo de callos, ensayo de enraizamiento 2. CATIE, 1998.

F. V.	TURGENCIA		DESARROLLO DE CALLO	
	Promedio	Rangos	Promedio	Rangos
S ₁ G ₃	0,03	B	0,00	B
S ₁ G ₆	0,40	A	0,20	A
S ₂ G ₃	0,03	B	0,03	B
S ₂ G ₆	0,77	A	0,77	A

Anexo 20 Diferencia mínima significativa para las variable presencia de hojas, ensayo de enraizamiento 2. CATIE, 1998.

F. V.	PRESENCIA DE HOJAS	
	Promedio	Rangos
G ₁ S ₁	0,09	A
G ₁ S ₂	0,10	A
G ₂ S ₁	0,12	A
G ₂ S ₂	0,04	B
G ₃ S ₁	0,13	A
G ₃ S ₂	0,11	A
G ₄ S ₁	0,11	A
G ₄ S ₂	0,12	A
G ₅ S ₁	0,08	A
G ₅ S ₂	0,03	A
G ₆ S ₁	0,46	B
G ₆ S ₂	0,92	A

Anexo 21 Análisis de varianza para las variables sanos, conhong, conbact y oxid para ápices de *Pouteria viridis*. CATIE, 1998.

FV	gl	CUADRADOS MEDIOS Y PROBABILIDADES							
		sanos	P	conhong	P	conbact	P	oxid	P
DESINFECCIÓN	7	0.646	0.0058**	0.634	0.0001**	0.081	NS	0.0042	NS
DIAS	7	0.371	0.0001**	0.093	0.0001**	0.081	0.0001	0.0018	NS
DESINF*DIAS	49	0.051	0.0020**	0.039	0.0001**	0.011	NS	0.0019	NS

*significación del 1%; *significacncia del 5%

Anexo 22 Diferencia mínima significativa para las variables presencia de ápices sanos y contaminados con hongos. CATIE, 1998.

F. V.	SA NOS		CON HONGOS	
	Promedio	Rangos	Promedio	Rangos
D De ₁	0,60	D	0,33	A
D De ₂	1,00	AB	0,00	C
D De ₃	0,80	BC	0,07	BC
D De ₄	0,93	AB	0,00	C
D De ₅	0,93	AB	0,00	C
D De ₆	1,00	AB	0,00	C
D De ₇	0,80	BC	0,07	BC
D De ₈	0,73	C	0,14	B

Anexo 23 Análisis de varianza para las variables sanos, conhong, conbact y oxid para ápices de *Pouteria viridis*. CATIE, 1998.

CUADRADOS MEDIOS Y PROBABILIDADES									
FV	gl	sanos	P	conhong	P	conbact	P	oxid	P
DESINFECCIÓN	1	4.002	0.0073**	2.94	0.0056**	3.84	0.0404*	1.82	NS
DIAS	5	8.014	0.0001**	0.099	0.0001**	1.591	0.0001**	3.85	0.0001**
DESINF*DIAS	5	0.326	0.0027**	0.06	0.0025**	0.012	NS	0.403	0.0002**

**significancia del 1%; *significancia del 5%

Anexo 24 Diferencia mínima significativa para las variables presencia de ápices sanos contaminados con hongos y con oxidación. CATIE, 1998.

F. V.	SA NOS		CON HONGOS		OXIDA CION	
	Promedio	Rangos	Promedio	Rangos	Promedio	Rangos
D De ₁	0,1	A	0,20	A	0,36	B
D De ₂	0,14	A	0,02	B	0,62	A

Anexo 25 Prueba de Tukey para la variable contaminación con bacteria. CATIE, 1998.

F. V.	CON BACT	
	Promedio	Rangos
De ₁	0,39	A
De ₂	0,23	B

Anexo 26 Análisis de varianza para las variables sanos, conhong, conbact y oxid para ápices de *Pouteria sapota*. CATIE, 1998.

CUADRADOS MEDIOS Y PROBABILIDADES									
FV	gl	sanos	P	conhong	P	conbact	P	oxid	P
DESINFECCIÓN	4	2.571	NS	0.848	NS	10.521	0.0001**	3.904	0.0405*
DIAS	7	1.203	0.0001**	0.043	0.0025**	0.251	0.0001**	0.199	0.0001**
DESINF*DIAS	28	0.064	NS	0.025	0.0056**	0.048	0.0052**	0.078	0.0001**

**significancia del 1%; *significancia del 5%.

Anexo 27 Diferencia mínima significativa para las variables presencia de ápices contaminados con bacterias, hongos y con oxidación. CATIE, 1998.

F. V.	CON BACTERIA		CON HONGOS		OXIDA CION	
	Promedio	Rangos	Promedio	Rangos	Promedio	Rangos
D De ₁	0,10	B	0,10	CD	0,40	B
D De ₂	0,00	B	0,20	C	0,10	C
D De ₃	0,00	B	0,00	D	0,80	A
D De ₄	0,30	A	0,90	A	0,10	C
D De ₅	0,10	B	0,60	B	0,30	B

Anexo 28 Análisis de varianza para las variables sanos, conhong, conbact y oxid para ápices de *Pouteria sapota*. CATIE, 1998.

CUADRADOS MEDIOS Y PROBABILIDADES									
FV	gl	sanos	P	conhong	P	conbact	P	oxid	P
DESINFECCIÓN	1	3.511	0.0244*	4.5	0.0047**	5.12	NS	4.351	0.0400**
DIAS	7	7.154	0.0001**	0.082	0.0001**	1.48	0.0001**	3.618	0.0001**
DESINF*DIAS	7	0.314	0.0001**	0.051	0.0004**	0.09	NS	0.408	0.0001**

**significancia del 1%; *significancia del 5%

Anexo 29 Diferencia mínima significativa para las variables presencia de ápices sanos, contaminados con hongos y con oxidación. CATIE, 1998.

F. V.	SA NOS		CON HONGOS		OXIDA CION	
	Promedio	Rangos	Promedio	Rangos	Promedio	Rangos
D De ₁	0,16	A	0,02	B	0,62	A
D De ₂	0,10	A	0,20	A	0,36	B

Anexo 30 Análisis de varianza para las variables sanos, conhong, conbact y oxid para ápices de *Pouteria sapota*. CATIE, 1998.

CUADRADOS MEDIOS Y PROBABILIDADES									
FV	gl	sanos	P	conhong	P	conbact	P	oxid	P
AGENTE	1	3,2	NS	1,203	0,0171*	0,300	NS	10,453	0,0002**
DIAS	7	6,175	0.0001**	0,017	0.0007**	1,521	0.0001**	1,476	0,0001**
AGENTE*DIAS	7	0,251	0.0001**	0,017	0.0007**	0,009	NS	0,333	0.0001**

**significancia del 1%; *significancia del 5%

Anexo 31 Diferencia mínima significativa para las variables presencia de ápices sanos, contaminados con hongos y con oxidación. CATIE, 1998.

F. V.	SA NOS		CON HONGOS		OXIDA CION	
	Promedio	Rangos	Promedio	Rangos	Promedio	Rangos
D Ag ₁	0,35	B	0,00	B	0,37	A
D Ag ₂	0,48	A	0,08	A	0,12	B