



Ciencias Agropecuarias
Universidad de Ciego de Avila



Trabajo de Diploma

Estudio fenológico y bromatológico de plantas de guayaba (*Psidium guajava* L.) var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 provenientes de la propagación *in vitro* y del enraizamiento de esquejes

Autora: Dayma S. Carmenates Hernández

Tutor: Dr. Reinaldo Trujillo Sánchez

Ing. Oscar Concepción Laffitte

"Año de la Revolución energética en Cuba"

Julio, 2006

RESUMEN:

El presente trabajo persigue realizar una caracterización fenológica y bromatológica de plantas de guayaba var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 provenientes del cultivo *in vitro* (vitroplantas) y del enraizamiento de esquejes (estacas). En el mismo se determinó la altura de las plantas (m), el diámetro de la copa (m), el diámetro del tronco (cm), el número de botones, flores y frutos por plantas. También se determinó el peso promedio de los frutos, diámetro polar, ecuatorial, de la base de la corola, el grosor del endocarpo, el número de semillas por fruto y el peso de estas. De las características químicas evaluadas a los frutos, se encuentran, el PH, Sólidos Solubles Totales (SST), acidez titulable y el contenido de Vitamina C (ácido ascórbico). Un análisis de cada parámetro permitió clasificar las vitroplantas y las estacas. En cuanto a los indicadores de crecimiento y arquitectura, el germoplasma de la guayaba se caracterizó por ser plantas de porte bajo en sentido general. En el caso del número de botones, flores y frutos se observó un pico floral a partir de la semana 24 de evaluación. Cualitativamente los frutos se caracterizaron en sentido general por ser de textura lisa y de color amarillo al madurar, con predominio de la forma redonda y el color rojo, con uniformidades el color de la pulpa. En cuantitativos químicos los mayores sólidos solubles se alcanzaron en las estacas con un valor de 9.20 °Brix y para el caso de las vitroplantas fue de 8.69 °Brix. El pH no constituyó un carácter diferenciador, al no encontrarse diferencias entre los dos grupos de plantas, para este se alcanzaron valores de 4.26 para las vitroplantas y 4.34 para las estacas. En la acidez tampoco se observaron diferencias, ya que los valores de ambos grupos ya que los valores de ambos grupos no sobrepasaron los 0.17 (%).

Los valores de vitamina C encontrados, la mayor concentración correspondió a las estacas con un valor de 444.12mg/100g de pulpa y para el caso de las vitroplantas se registro un valor promedio de 381.7112mg/100g de pulpa.

INDICE:

1	INTRODUCCION	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	Origen, distribución y características generales del <i>Psidium guajava</i> L.	4
2.2	Importancia y usos de la guayaba.	5
2.3	Principales países productores de guayaba.	5
2.4	Producción de guayaba en Cuba.	6
2.5	Características de los cultivares Enana Roja Cubana más importantes.	6
2.5.1	<i>Enana Roja Cubana EEA 18-40.</i>	6
2.5.2	<i>Enana Roja Cubana EEA 1-23.</i>	7
2.6	Propagación del <i>Psidium guajava</i> L.	7
2.6.1	<i>Métodos convencionales de propagación en la guayaba.</i>	7
2.6.2	<i>Micropropagación o propagación in vitro de la guayaba.</i>	8
2.7	Fisiología del cultivo de la guayaba.	9
2.8	Factores climáticos de interés para el cultivo de la guayaba.	12
2.9	Otros aspectos del cultivo de la guayaba.	12
2.9.1	<i>Marcos de plantación más utilizados.</i>	12
2.9.2	<i>Cosecha de los frutos.</i>	13
2.9.3	<i>Principales criterios de selección utilizados en el cultivo de la guayaba.</i>	13
2.10	Variación en el cultivo y regeneración de plantas <i>in vitro</i> .	15
2.10.1	<i>Causas de la inducción de la variabilidad genética in vitro.</i>	15
2.10.2	<i>Variabilidad somaclonal.</i>	17
2.10.3	<i>Factores que influyen en la causa de la variación.</i>	17
2.11	Consideraciones finales.	18
3	MATERIALES Y MÉTODOS.	19
3.0	Diseño, montaje y atenciones culturales del experimento.	19
3.0.1	<i>Ubicación del área de estudio</i>	19
3.0.2	<i>Características de las plantas.</i>	19
3.0.3	<i>Plantación en campo y diseño experimental.</i>	19
3.0.4	<i>Agrotecnia del cultivo.</i>	20
3.1	Estudio fenológico.	20
3.1.1	<i>Operaciones de medición</i>	20

3.2	Análisis bromatológico.	21
3.2.1	<i>Caracteres físicos cuantitativos.</i>	21
3.2.2	<i>Caracteres físicos cualitativos.</i>	22
3.2.3	<i>Caracteres químicos.</i>	22
3.3	Procesamiento estadístico.	22
3.4	Datos climáticos de la región.	22
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	23
4.1	Estudio fenológico.	23
4.2	Análisis bromatológico.	32
5	CONCLUSIONES	39
6	RECOMENDACIONES	40
7	BBIBLIOGRAFÍA	41

1. INTRODUCCION:

La especie *Psidium guajava* L., denominada comúnmente guayaba, es un árbol tropical que produce una fruta que despierta gran interés en los consumidores por su delicioso aroma y palatabilidad. Es cultivada en países como África, India, Hawai, Brasil, Puerto Rico, Estados Unidos y Cuba. (Cañizares, 1968; Peña *et al.*, 1996). También se pueden mencionar otros países como Colombia, Costa Rica y México (Ventocilla y De Rubalcaba, 2003).

La guayaba es la especie más destacada dentro de la gran familia de las *Myrtaceae*, por el alto valor nutritivo de su fruta y sus múltiples usos (Cañizares, 1968; Hamid, 1998). Es una de las fuentes más ricas de vitamina C conocida, pues contiene de 200 a 400 mg por 100 g de peso fresco (Cañizares, 1968; Peña *et al.*, 1996; Adel, 2002). Supera cinco veces al contenido de la naranja y otros cítricos. El cultivo fue domesticado por los indígenas en América, su centro de origen se localiza en un punto ubicado entre México y Perú. En Cuba existe desde antes del descubrimiento por los españoles, pero su desarrollo comienza después del triunfo de la revolución.

El cultivo se incrementó sustancialmente usando variedades de porte alto, fundamentalmente los clones N-6 de pulpa rosada; N-2, N-4 de pulpa roja; N-7, N-8 de pulpa blanca, Suprema Roja y Belic. Actualmente, las plantaciones se desarrollan con otras perspectivas y se utilizan fundamentalmente cultivares de porte bajo entre los que se destaca el cultivar Enana Roja Cubana EEA18-40 y el EEA 1-23 que fueron obtenidos en el país en la década del 60 en la Estación Experimental Agronómica de Santiago de las Vegas (Estación Nacional de Frutales, 1995). Estas variedades ocupan aproximadamente el 52 % del área cultivada en el país y aportan el 84% de la cosecha (Pages, 2004).

La forma más común de propagar la guayaba, para obtener las cantidades de plantas necesarias para establecer los sistemas de producción, esta basada en la propagación vegetativa usando los métodos de injerto y estacas fundamentalmente (Peña *et al.*, 1996). Ambos métodos resultan poco eficientes a la hora de obtener grandes cantidades de plantas a partir de pocos individuos mejorados genéticamente. El injerto se ve afectado severamente por la contaminación ambiental y por otro lado la falta de porta injerto en algunos casos (Vilchez *et al.*, 1997). La estaca es un proceso más lento que se encuentra afectado por una alta fenolización durante del enraizamiento y es muy susceptible al ataque de patógenos, lo

que provoca que la eficiencia sea regularmente baja (Ramírez *et al.*, 1999). En el caso de la semilla se plantea que posee una alta variabilidad genética (Peña *et al.*, 1996; Pontikis, 1996). Por esas razones se han introducido con éxito otros métodos de propagación mediante el cultivo de tejidos, especialmente en variedades de la región asiática (Amin y Jaiswal, 1987, 1988; Jaiswal y Amin, 1987; Loh y Rao, 1989). Algunos intentos en cultivares de la región del Caribe no han resultado tan exitosos (Ramírez y Salazar, 1997).

En Cuba, el Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila inició en el año 2000 un proyecto de investigación con la variedad Enana Roja Cubana EEA 18-40. Los primeros trabajos conllevaron el uso de material vegetal de semillas recién germinadas (Pérez *et al.*, 2002). A pesar de esto, los esfuerzos por lograr un procedimiento de clonación verdadera no cesaron y en la actualidad se cuenta con un procedimiento que utiliza explantes juveniles procedentes de rebrotes de raíz de plantas elites cultivadas y seleccionadas en el campo (Nápoles, 2003; Concepción *et al.*, 2005).

La variabilidad genética introducida por los métodos de propagación acelerada por cultivo de células y tejidos resulta una barrera importante en la aplicación de éstos procedimientos, a pesar de que los fitomejoradores lo consideren un beneficio adicional del proceso (Krikorian, 1993). Cuando se obtiene una población de plantas *in vitro*, las variaciones que se presentan pueden estar dadas por tres causas fundamentales: mutaciones, cambios epigenéticos y otras modificaciones provocadas por el rejuvenecimiento fisiológico, además de un marcado efecto del ambiente (Pérez-Ponce, 1998). Para determinar estas variaciones se utilizan diversos métodos o técnicas celulares y/o moleculares que basan sus principios en comparaciones del material genético (Sabir *et al.*, 1992; Damasco *et al.*, 1996). Sin embargo, el estudio del comportamiento agro-morfológico de los individuos en condiciones de campo es el principal elemento que define la magnitud y expresión real de la variación genética (Sandoval *et al.*, 1991; 1997).

En los trabajos de propagación *in vitro* de la guayaba, publicados con anterioridad, no se ha tenido en cuenta la estabilidad genética del material producido pues no se ha estudiado el comportamiento morfoagronómico de las vitroplantas en condiciones de campo. En la mayoría de estos trabajos solo se hace referencia a su comportamiento en condiciones de aclimatización (Amin y Jaiswal, 1987, 1988; Jaiswal y Amin, 1987; Loh y Rao, 1989). En

escasos trabajos se ha abordado este tema sin embargo solo de material vegetal procedente de semillas germinadas *in vitro* y con un enfoque más orientado a la selección de líneas clonales (Collado *et al.*, 2002; Guerrero *et al.*, 2004; Nápoles *et al.*, 2004; García *et al.*, 2004; Sosa *et al.*, 2004). Por tanto un estudio agro-morfológico comparativo entre las vitroplantas producidas por la técnica de cultivo *in vitro* y plantas propagadas vegetativamente por métodos convencionales como el enraizamiento de esquejes resulta indispensable, permitirá reconocer el nivel de estabilidad genética que mantiene dicho procedimiento.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, se puede plantear la siguiente hipótesis de trabajo:

HIPÓTESIS: Es posible determinar el nivel de estabilidad fenotípica del método de propagación *in vitro*, si se realiza una comparación entre las plantas de guayaba var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 producidas por esa vía y plantas provenientes del enraizamiento de esquejes, mediante un estudio fenológico del árbol y bromatológico del fruto.

Para dar cumplimiento a la hipótesis planteada, el objetivo del presente trabajo es:

OBJETIVO: Comparar la fenología del árbol y las cualidades bromatológicas del fruto de plantas de guayaba var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 provenientes de la propagación *in vitro* y del enraizamiento de esquejes.

NOVEDAD CIENTÍFICA: Se realiza por primera vez en Cuba una comparación fenológica y bromatológica de plantas de guayaba obtenidas mediante un procedimiento de propagación clonal por cultivos de tejidos y plantas propagadas por esquejes enraizados.

VALOR PRÁCTICO: Con la comparación fenológica y bromatológica de las plantas de guayaba var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 obtenidas mediante la propagación *in vitro* y el enraizamiento de esqueje, se avala el proceso biotecnológico. Esto permite su completa liberación para aplicarlo a gran escala e introducirlo en las biofábricas del país y en el esquema nacional de propagación trazado para esta variedad comercial.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:

2.1 Origen, distribución y características generales del *Psidium guajava* L.

El cultivo de la guayaba fue domesticado hace 2000 años por los indígenas, su primer registró data de 1526 cuando el español Gonzalo Fernández de Oviedo y Valdez reconoce a esta planta como guayabo y a su fruta como guayaba empleando los vocablos con que los indígenas antillanos la denominaban. Su Centro de Origen se ubica en un punto localizado entre México y Perú por encontrarse en esta zona la mayor diversidad de esta especie (Cañizares, 1968).

A partir de su descubrimiento en el “Nuevo Mundo” su distribución se agilizó de manera extraordinaria. En la actualidad es un árbol que se encuentra naturalizado en todas las zonas tropicales y subtropicales del planeta (Hamid, 1998).

Esta planta se encuentra ubicada taxonómicamente en la gran división *Spermatophyta*, subdivisión *Magnoliophytina*, Clase *Magnoleatae*, orden *Mirtales*, familia *Myrtaceae*, género *Psidium*. La familia de las *Myrtaceae* esta compuesta por 75 géneros y un poco más de 3000 especies. De esta amplia gama solo algunos géneros sirven como frutales, destacándose por las características de su fruto y uso la especie *Psidium guajava* L. El género *Psidium* en la familia *Myrtaceae* contiene aproximadamente 150 especies. De la mayoría se conoce muy poco, siendo la más conocida el *Psidium guajava* L., debido a su amplia distribución y a su uso como cultivo frutal (Hamid, 1998).

El árbol de la guayaba es de porte bajo y con mucho follaje, que en ocasiones alcanza de 2-9 m de altura, adquiriendo su tronco hasta 30 cm de diámetro. El tallo tiene forma cilíndrica, de consistencia dura y leñosa. Las ramas más jóvenes y las terminales son de color verde, tetragonales y ligeramente pubescente. Las ramas adultas son cilíndricas y su corteza, al igual que la del tallo principal, es de color carmelita verdoso o avellanado, siendo en ocasiones lisa y brillante (Peña *et al.*, 1996). En cuanto al ciclo de vida productiva de la planta puede oscilar entre 20 y 40 años, iniciando su producción entre los primeros seis y diez meses (Gaillard, 1978).

El fruto es una baya que se desarrolla a partir de un ovario compuesto de forma variada, algunos pueden ser redondeados, oblongos o periformes y pueden pesar hasta 400 gramos. La superficie de la piel puede ser lisa y cerosa, el color de la pulpa puede ser diferente:

blanco, amarillo, rosado o rojo; con sabor y textura variadas, con olor característico. Los frutos de mejor calidad tienen una textura suave y fina, otros tienen una textura arenosa. El sabor varía desde dulce, ácido y muy ácido, en pocos casos insípidos. La cantidad de semilla es variable de 100 a 500 semillas (MINAGRI, 2004a).

2.2 Importancia y usos de la guayaba.

El cultivo de la guayaba posee importancia tanto para el comercio mundial como para la economía doméstica (Yadava, 1996). Ofrece variadas posibilidades a los productores, ya que pueden usar su producción para su consumo interno, destinarlo al consumo fresco o como fuente de materia prima en la industrias para la obtención de productos derivados como: refrescos, helados, jalea, cascós, mermeladas, compotas y néctares aportando a su economía y a la del país (Yadava, 1996).

Otro importante uso de la guayaba se encuentra en la medicina tradicional como astringente y contra infecciones dermatológicas, así como para la confección de fármacos (Morton, 1987; Singh, 1992; Gutiérrez *et al.*, 2000). Además de su propiedad astringente suele ser utilizada en la medicina para tratar gastroenteritis, diarreas y disenterías (Morton, 1987); así como para reducir la tensión arterial y los niveles de colesterol y triacilgliceridos de la sangre (Sing *et al.*, 1992). También se conoce que ayudan a prevenir el cáncer, tiene un reconocido efecto sobre el sistema digestivo e inmunitario y obran contra el envejecimiento por su efecto antioxidante (Pumar y Cabrera, 2003).

También se encuentra el caso del *Psidium salutare* Berg. (Guayabita del pinar), que es muy abundante en la provincia de Pinar del Río y la Isla de la Juventud, y se utiliza con fines industriales en la confección de bebidas alcohólicas (Peña *et al.*, 1996).

2.3 Principales países productores de guayaba.

La producción mundial de frutas, ha aumentado en 20 millones de toneladas en el último decenio hasta alcanzar las 61.4 millones de toneladas en el año 2000. La guayaba a pesar de no estar en la cumbre de las frutas tropicales goza de un gran prestigio a nivel mundial (FAO, 2001). Existe un gran número de países, productores de guayaba, entre los que se destacan Brasil, Colombia, Sudáfrica, Egipto, la India, Australia, Filipinas, Hawaii, República Dominicana, Haití, Guyana, Estados Unidos (Florida) y Nueva Zelanda (Yadava, 1994).

2.4 Producción de guayaba en Cuba.

En Cuba se lleva a cabo la producción y comercialización de la guayaba se realiza dentro del marco de los programas agrícolas orientados a nivel nacional por el Estado y para ello existen numerosas empresas e instituciones. El Sistema Empresarial Frutícola esta integrado por tres empresas especializadas: La Empresa Arimao en Cienfuegos, La Empresa de la Piña, en Ciego de Ávila y la Empresa del Coco, en Baracoa (Guantánamo). La sociedad mercantil Cítricos Caribe S.A. es la encargada de la actividad importadora y exportadora de las producciones de frutos cítricos. Mientras que la Empresa Frutas Selectas es la entidad encargada de la comercialización del resto de las frutas tropicales, principalmente el mango, la papaya, la guayaba, los cocos, las piñas y el aguacate (Pumar y Cabrera, 2003).

La guayaba ocupa el 10% de la estructura actual de frutales en la isla, sólo superada por el mango, el coco y la papaya (Pages, 2004). Su consumo como fruta fresca es esencialmente a nivel nacional, mientras que los productos procesados en conservas y néctar incrementan su demanda. Las variedades de porte bajo del grupo de las Enana Roja Cubana son las de mayor demanda por parte de los productores. Estas, en la actualidad, constituyen el 52% del área cultivada y contribuyen al 84% de la cosecha a nivel nacional (Pages, 2004).

2.5 Características de los cultivares Enana Roja Cubana más importantes.

En Cuba tras largos años de investigación y de esfuerzos por el mejoramiento genético de la guayaba se han logrado introducir y obtener algunas variedades. Las de mayor impacto se caracterizan a continuación:

2.5.1 Enana Roja Cubana EEA 18-40.

Es un cultivar obtenido en Cuba por selección en la década del 60 en la Estación Experimental Agronómica (EEA) de Santiago de las Vegas, es de porte pequeño de follaje denso con ramas extendidas, de copa 3 m aproximadamente a los 5 años de edad y una altura de 2,7 m. Su producción comienza a los seis meses de injertada. El fruto es una baya de forma ovoide, de mediana a grande, de epicarpio liso, de poco espesor, y de color amarillo claro. El mesocarpio es de color rosado, grueso de baja granulación con numerosas semillas, que puede ser usado para la industria y el consumo fresco. Es un cultivar muy productivo reportándose en condiciones experimentales a distancia de siembra de 4,5 x 1,5 rendimientos de hasta 100 t/ha (Peña *et al.*, 1996).

2.5.2 *Enana Roja Cubana* EEA 1-23

Es un cultivar cubano. De porte pequeño con ramas extendidas de follaje poco denso de hojas medianas con una copa de 5 m y una altura de 3.0 m a los cinco años de edad. El fruto es grande ovalado de mesocarpio de color rosado algo arenoso, dulce, con sabor agradable. El epicarpio es liso de poco espesor, de color amarillo cuando está maduro, presenta muchas semillas. Cuando es cultivado intensivamente se logran rendimientos de 30 t/ha (Peña *et al.*, 1996)

2.6 Propagación del *Psidium guajava* L.

2.6.1 *Métodos convencionales de propagación en la guayaba.*

El modo de propagación natural de esta especie es por semilla, razón por la cual a través de miles de generaciones haya acumulado en su potencial ese infinito número de formas, tamaños colores; hasta en la estructura y otras cualidades de las plantas, en las que se encuentran diferencias notables como forma, color de sus hojas, rusticidad, adaptabilidad, etc. (Tong *et al.*, 1991). Las semillas de la guayaba se mantienen viables por varios meses. A menudo germinan en 2 o 3 semanas, pero puede tomar hasta 8 semanas. Pre - tratamientos con ácido sulfúrico, o hervir las semillas por 5 minutos o remojando la semilla por 2 semanas se acelera la germinación (Aguilera, 2001).

En la propagación asexual, los métodos más empleados para la multiplicación masiva de la guayaba son los injertos, las estacas, y en menor cuantía el acodo. Este último método es usado en caso que los antes mencionados no se puedan efectuar (Cañizares, 1968).

En el cultivo de la guayaba se usan diferentes tipos de injertos como son: el de yema en chapa, yema de escudete con y sin madera e injerto de corona. Los mejores resultados en Cuba se han obtenido con el de yema en chapa que ha permitido en ocasiones obtener el ciento por ciento de unión con el patrón de injerto (Peña *et al.*, 1996). En estudios realizados en el municipio de Zulia en Venezuela, se utilizaron otros métodos de injerto entre los que se destacan el de cuña lateral y enchape lateral (Ramírez *et al.*, 1999).

En la multiplicación por estacas solo es necesario que se desarrolle un nuevo sistema de raíces adventicias, debido a que la estaca posee yemas con aptitud potencial para desarrollar nuevos vástagos (Hartmann *et al.*, 1992). La obtención de plantas a partir de

estacas es un proceso lento que se ve afectado por la fenolización y por la acción de microorganismos patógenos, lo cual trae consigo que el porcentaje de supervivencia sea bajo (Ramírez *et al.*, 1999).

2.6.2 Micropropagación o propagación *in vitro* de la guayaba.

En la actualidad la micropropagación o propagación *in vitro* se utiliza en gran número de especies hortícolas, ornamentales, y más reciente en las forestales. Esta tecnología permite producir grandes cantidades de plantas en un menor tiempo, en espacio reducido, obteniéndose plantas vigorosas y saludables (Villalobos y Torpe, 1991).

La micropropagación se ha llevado a cabo en las *Myrtaceae* con excelentes resultados. Ejemplo de ello lo constituyen la multiplicación de la *Melaleuca alterifolia*, conocida como árbol del te que posee gran importancia en la industria aceitera en Australia (List *et al.*, 1996) y el cultivo *in vitro* de la guayaba serrana (*Feijoa sellowiana* Berg), especie nativa de importancia comercial y cultivada en la parte meridional brasileña (Dal Vesco, 1998).

En el *Psidium guajava* L. existen varios ejemplos donde se aplica con éxito la propagación *in vitro* a través de las técnicas de cultivo de tejidos, especialmente en genotipos de la región asiática (Amin y Jaiswal, 1987, 1988; Jaiswal y Amin, 1987; Loh y Rao, 1989; Papadatou *et al.*, 1990; Siddiqui y Farooq, 1996). En sentido general estos trabajos despliegan su mayor esfuerzo en las etapas iniciales del proceso, pues sin lugar a dudas se trata de un cultivo recalcitrante y con dificultades para su inoculación en condiciones asépticas.

Las principales dificultades están relacionadas con altos índices de contaminación, con el efecto negativo de una abundante excreción de compuestos fenólicos y a su vez con una lenta brotación de las yemas axilares y apicales en los explantes recién inoculados (Amin y Jaiswal, 1987, 1988; Jaiswal y Amin, 1987; Loh y Rao, 1989; Papadatou *et al.*, 1990; Siddiqui y Farooq, 1996). Las dificultades que existen con el establecimiento *in vitro* de explantes procedentes de plantas adulta han provocado que en algunos casos se utilice material vegetal procedente de semillas germinadas *in vitro* (Mohamed-Yasen *et al.*, 1995). Otros trabajos han informado la obtención de segmentos nodales estériles procedentes de plantas jóvenes de 4 a 6 meses de edad (Siddiqui y Farooq, 1996).

Pontikis (1996), hace una recopilación de trabajos sobre el uso del cultivo *in vitro* para la propagación de importantes variedades comerciales de guayaba. La razón de multiplicación

es de 3 a 4 por subcultivo para Amin y Jaiswal (1988), mientras para Loh y Rao (1989) la media de brotes regenerados por explantes es de 5.68 en segmentos de hipocótilo, de 1.29 para brotes apicales y de 3.2 para segmentos nodales después de 8 semanas de cultivo. Por su parte Papadatou *et al.* (1990) obtienen un promedio de 10 brotes por explante después de 16 semanas de cultivo.

La transferencia de las plantas a las condiciones naturales no parece ser afectada severamente pues en sentido general se muestran porcentajes de supervivencia que oscilan entre 70 y 80% (Amin y Jaiswal, 1988; Loh y Rao, 1989; Papadatou *et al.*, 1990).

Una de las primeras experiencias del cultivo *in vitro* en Cuba en el género *Psidium* fue con la especie *P. salature* Berg., impulsado por un programa de recuperación y conservación de la especie por vía biotecnológica. En ésta se logró la micropropagación a partir de segmentos nodales de brotes jóvenes de ramas leñosas (Sotolongo, 1998).

En la variedad Enana Roja Cubana EEA18-40 se llevó a cabo una metodología de micropropagación a partir de semillas germinadas *in vitro* (Pérez *et al.*, 2002), que aunque exitosa no pudo ser aplicada masivamente debido a la variabilidad genética inherente a la semilla (Pontikis, 1996). Por esa razón los esfuerzos por lograr un procedimiento de clonación verdadera no cesaron y se logró, recientemente, un protocolo que utiliza explantes juveniles procedentes de rebrotes de raíz de plantas elites cultivadas y seleccionadas en el campo (Nápoles, 2003; Concepción *et al.*, 2005).

2.7 Fisiología del cultivo de la guayaba.

La planta de guayaba pasa por diferentes fases de desarrollo las cuales se caracterizan por cambios cualitativos y cuantitativos que les permite pasar de una simple semilla a un fruto completo. Sus principales fases son: germinación, crecimiento y desarrollo, floración, fructificación y maduración. La floración, fructificación y maduración son fases que se repiten cíclicamente durante la vida de la planta (Mederos, 1988).

Germinación: Es el proceso que se efectúa en la semilla y concluye con la aparición de una nueva planta. En éstas ocurren cambios a consecuencia de la activación de enzimas y de diferentes hormonas capaces de transformar, con la influencia de factores ambientales como la temperatura, la humedad y el oxígeno, sustancias complejas en más simples, lo que favorece la realización del proceso (Vázquez y Torres, 1995).

Crecimiento y desarrollo: Durante esta fase la planta crece en longitud y grosor, va acumulando sustancias de reservas que se utilizan en fases futuras del desarrollo como son la floración, fructificación y maduración de los frutos (Mederos, 1988).

Los meristemas tienen la capacidad de crecimiento. Estos se distribuyen en los ápices de tallos y raíces y en el denominado tejido cambial. En los primeros se produce el crecimiento en longitud, en el último en grosor. El crecimiento de la planta está regulado genéticamente, aunque también por factores externos como la temperatura, que actúa estimulando el crecimiento hasta cierto límite y luego actúa como inhibidor. El crecimiento está en estrecha relación con la nutrición, por ello todo lo que suponga una mejoría de ésta se traducirá en un mayor crecimiento (Barcelot *et al.*, 1992)

El crecimiento se puede expresar de forma práctica midiendo las variaciones de longitud y grosor. Este crecimiento es continuo y se produce, porque a medida que aumenta la biomasa de la planta, se incrementa el número de células meristemáticas y el área fotosintética, lo que a su vez determina un mayor potencial de crecimiento, representativo de la llamada fase exponencial de la curva. También se expresa un crecimiento durante todo el año bajo condiciones Tropicales, cosa que no ocurre en zonas con características diferentes donde la planta crece en determinadas épocas (Avilán *et al.*, 1989).

Floración: Esta fase comienza con la aparición de los primordios florales, los cuales se convierten en botones y luego es que ocurre la apertura de la flor (antesis). El período en que se mantiene la flor abierta es corto, pues una vez que ha ocurrido la antesis, ocurre la polinización y con ella la fecundación. Las flores son hermafroditas y se producen en la periferia del árbol, lo que limita su producción, haciendo necesaria la aplicación de la poda (Mederos, 1988).

Las floraciones en esta especie se localizan en las axilas de las hojas en las nuevas ramas y brindillas (brotes fructíferos) en crecimiento indiferentemente de la época del año cuando las atenciones culturales y las condiciones climáticas son propicias. Se pueden apreciar floraciones erráticas en aquellas ramas provistas de hojas que reciben una mayor luminosidad, cuando son curvadas por el propio peso de su sistema foliar o de sus frutos, también cuando las ramas son afectadas o rotas por diferentes motivos (Peña *et al.*, 1996).

En diversos estudios se evidencian que los estigmas están receptivos tres ó cuatro horas

después de la antesis y permanecen funcionando por 48 horas aproximadamente. Sin embargo otros autores plantean que este período es más amplio y que el estigma se puede encontrar receptivo un día antes de la apertura de la flor y continuar así hasta el tercer día después de la apertura de ésta. Se ha observado que la antesis en el guayabo se realiza en la mañana cuestión que debe tomarse en consideración para los trabajos de polinización controlada. Por otra parte, la dehiscencia del polen comienza posterior a la antesis y tiene una duración entre 60 y 90 minutos en dependencia del cultivar y de las condiciones climáticas. La forma y tamaño del polen es variable y parece influir en ello el medio utilizado para su observación. Diferentes autores informan que el polen permanece viable sólo durante cuatro horas después de la antesis, por un día en condiciones de campo y de 90 a 135 días cuando se almacena una temperatura entre 0 y 4,5 °C y entre 0 y 25 % de humedad relativa. Los granos de polen mantienen su capacidad de germinación durante mayor tiempo que su capacidad de fertilización (Caraballo, 2001; MINAGRI, 2004a).

Fructificación: Comienza con la fecundación de la flor y termina con la caída o recolección del fruto. En esta etapa se producen cambios bioquímicos que son lo encargados de la formación, crecimiento y desarrollo de los frutos. El fruto a medida que crece y se desarrolla acumula una serie de sustancias las cuales se transforman en otras, a medida que este se acerca a la madurez. En todo el proceso actúan hormonas específicas y enzimas que son las encargadas de su activación según las influencias de los factores internos de la propia planta.

Maduración: Es el último proceso que ocurre en la fase de fructificación, en la que se producen una serie de cambios, generalmente coordinados, que conducen a la senescencia y abscisión del fruto. La finalidad del fruto es favorecer la dispersión de las semillas, y la combinación de las características de color, aroma, textura y gusto contribuyen a ello (Ascon-Bieto y Talón, 1993).

La maduración es una actividad metabólica que requiere gasto de energía, por ello se retarda la respiración, lo cual constituye la base de la conservación del fruto y en específico de la guayaba. Se ha comprobado que los frutos, cosechados verdes, pueden ser almacenados a temperaturas de 8-10°C y una humedad relativa del 90%. En estas condiciones, previo una desinfección y parafinación, se mantienen los frutos de dos a tres meses (Peña *et al.*, 1996).

Este período de flor a fruto está muy influenciado por las condiciones climáticas, la disponibilidad de agua y nutrientes. Esto hace que el tiempo transcurrido entre la emergencia de las flores y la maduración del fruto fluctúe entre cinco y seis meses. (MINAGRI, 2004a).

2.8 Factores climáticos de interés para el cultivo de la guayaba.

El clima cubano le ofrece a la guayaba unas condiciones favorables para su crecimiento y desarrollo. Aún así, está sujeto a la incidencia de las variables meteorológicas, sobre todo en los meses de sequía, cuando las plantaciones se encuentran bajo su efecto. Por ello se les debe prestar atención sobre todo a la acción combinada de estas variables en este período.

Temperatura: La guayaba es capaz de soportar altas temperaturas, de 45°C o más. Las temperaturas por debajo de 17°C le pueden ocasionar la muerte a las plantas jóvenes, mientras que las plantas adultas pueden soportar hasta 3°C, en esta no llega a ocurrir la maduración de los frutos. Por debajo de 0°C es extremadamente dañina para la planta en general. Para un desarrollo óptimo las temperaturas deben oscilar entre 23 y 28°C (MINAGRI, 2004a).

Precipitación: La guayaba es una fruta que se desarrolla bien en áreas que reciben precipitaciones con media anual desde 1000 hasta 2000 mm y pueden prosperar en condiciones de mayor humedad. En condiciones de muy alta humedad disminuye la calidad de la fruta a pesar de que presenta un desarrollo normal incluso en zonas con pluviometría de 1000 - 4500 mm (González y Sourd, 1985).

Viento: Los vientos normales son beneficiosos para el cultivo de la guayaba, ya que permiten contrarrestar el efecto de otros factores climáticos específicamente la temperatura. Cuando estos son fuertes afectan el follaje especialmente las hojas, tumban las flores, dañan los frutos, los que se tornan más secos por la excesiva transpiración. Se plantea que vientos fuertes constantes desecan las hojas y provocan su caída (Peña *et al.*, 1996).

2.9 Otros aspectos del cultivo de la guayaba.

2.9.1 Marcos de plantación más utilizados.

En el caso específico de la guayaba Enana Roja Cubana están definidos los marcos de plantación de: 5.0 x 2.0 m ó 4.5 x 1.5 m, los cuales permiten una densidad de plantación: de

1000 y 1481 plantas por hectárea, respectivamente, para obtener rendimientos de hasta 70 t/ha (MINAGRI, 2004a).

2.9.2 Cosecha de los frutos.

En Cuba existen dos épocas óptimas de cosecha verano e invierno. En el verano la cosecha se realiza en los meses de agosto y septiembre; siendo esta la época donde se obtienen mayores producciones. En invierno la cosecha se extiende desde los meses de enero a abril; en esta época aunque se extiende el periodo de la cosecha las producciones son menores (Mederos, 1988).

Las guayabas se cosechan en madurez fisiológica, en el estado verde-maduro (cambio de color del verde oscuro al claro) en países donde los consumidores las prefieren en este estado. En naciones donde los consumidores prefieren las guayabas maduras, las frutas se cosechan en estados firme-maduros a madurez media de consumo (más blandas) para un transporte de larga distancia, o bien en plena madurez de consumo (amarilla y blanda) para mercados locales (Adel, 2002).

2.9.3 Principales criterios de selección utilizados en el cultivo de la guayaba.

La selección de plantas requiere del establecimiento de criterios de selección previos. Estos criterios difieren dependiendo del destino que tenga la fruta ya sea para la industrialización o para consumirla en la mesa. De acuerdo con Laura y Arango (2001), en varios países productores de guayaba coinciden en tener en cuenta los siguientes criterios:

- Acidez total: Para frutos de mesa se buscan tipos dulces con una acidez total de 0.15% a 0.35% y para la industria se emplean frutos con 1.5% a 2.5% de acidez total lo que permite una mejor conservación y control de calidad.
- Color de la pulpa: se encuentran rosa, amarillo y blanco. Tanto para jugo como para consumo en fresco, se prefieren frutos de color rosa intenso.
- Sólidos Solubles Totales: entre 9 a 12 % de azúcares totales son aceptables para el consumo en fresco y para la industria.
- Contenido de semillas: se prefiere frutos con menos del 2% del peso total.
- Relación pulpa semilla: los rangos varían de 75% como mínimo a 90% como muy buena.
- Grosor de la pulpa: debe ser mayor de 15 mm.
- Contenido de vitamina C: entre 200 y 300 mg/100 g de muestra se considera satisfactoria.

- Peso y tamaño del fruto: puede variar entre 200 y 350 g
- Sabor: mas dulce cuando se destina para el consumo fresco y más ácido cuando sea para industrializar.
- Aroma: debe ser el característico pero agradable.
- Rendimiento de fruta: 227 kg/planta o más. México 150 a 180 kg./árbol: Hawai 200 a 250 kg./árbol, Brasil 100 kg/árbol y Colombia 300 a 400 kg./árbol en cultivares mejorados.
- Tolerancia a enfermedades y plagas: los mayores problemas fitosanitarios registrados en Colombia son causados por la mosca de la guayaba y los nemátodos.

Según González *et al.*, (1985) de acuerdo con las investigaciones y experiencias de las procesadoras comerciales en Cuba existen ciertas características deseables en una *guayaba* ideal para procesar o industrializar. Estas son:

- Peso del a fruta 200 – 285 g
- Diámetro de la fruta 7.8 cm
- Diámetro de la cavidad de la fruta 3.8 cm
- Color Rosado
- Sabor agradable
- Sólidos solubles 9 – 12 %
- Vitamina C 300 g o mas de ácido ascórbico en 100 g de pulpa.

Gran parte de los cultivos o plantaciones de guayaba en otros países y en Colombia, se han establecido con plantas provenientes de semilla, razón por la cual tanto los árboles como los frutos presentan una gran heterogeneidad. Esta variabilidad es importante para la selección de clones superiores, con características deseables tanto de las plantas como de los frutos. Sin embargo, la gran heterogeneidad de las plantas respecto a la forma, vigor, producción y calidad ocasiona muchas dificultades en las labores de control fitosanitario principalmente y una reducción de las producciones promedio debido a la presencia de árboles poco productivos o con frutos inadecuados para el procesamiento. Una gran variación de las características de los frutos (peso y forma, grosor, color de la pulpa, contenidos de azúcares, acidez y pectinas, etc.) imposibilita la producción estandarizada de productos de alta calidad (Laura y Arango, 2001).

2.10 Variación en el cultivo y regeneración de plantas *in vitro*.

El cultivo *in vitro* del material vegetal puede inducir y manifestar diferencias entre células, tejido y órganos. Estas diferencias pueden determinar que algunas de las plantas regeneradas sean físicamente diferentes de las plantas madres de la cual se derivaron, en donde los cambios ocurren usualmente de forma espontánea y no son posibles de controlar.

Las técnicas biotecnológicas para la producción de semillas tienen en contraposición que requieren la máxima estabilidad genética, mientras que para el mejoramiento genético se buscan cambios que transformen el material hereditario (Pérez-Ponce, 1998). De acuerdo con George (1993), existen dos tipos de variación, aquella en la que ocurre un cambio genético permanente y en la que el cambio es temporal.

2.10.1 Causas de la inducción de la variabilidad genética in vitro.

Cuando se obtiene una población de plantas *in vitro*, las variaciones que se presentan pueden estar dadas por tres causas fundamentales: mutaciones, cambios epigenéticos y por el rejuvenecimiento fisiológico. Unido a esto también puede existir un marcado efecto del ambiente (Pérez-Ponce 1998).

En el caso de las mutaciones la mayoría de los investigadores han encontrado como causa fundamental la poliploidía, la aneuploidía y las mutaciones genómicas. Dentro de estas últimas se han señalado todas las conocidas en la genética clásica como translocaciones, inversiones y deleciones (Ahlowalia, 1983).

Con el desarrollo del cultivo *in vitro* surge el concepto de cambios epigenéticos, el cual se denomina a los cambios genotípicos que son generados por los genes que son estimulados y se expresan por los efectos del cultivo *in vitro*. Este tipo de variación se diferencia de las verdaderas mutaciones en que no segrega en las progenies ni cumple con las leyes de la herencia, y aunque puede transmitirse por varios ciclos de reproducción o multiplicación, siempre desaparecen (Pérez-Ponce 1998). Meins (1983) relacionó en tabaco los cambios epigenéticos con la habituación de los cultivos *in vitro*, fundamentalmente a las citoquininas. Esta habituación consiste en poner en funcionamiento genes que normalmente no lo hacen y que en el caso del tabaco lo que se señala es la producción de citoquininas *in vitro*.

En cuanto al rejuvenecimiento este no está relacionado con el desarrollo ontogénico que solo

se produce en la reproducción sexual, pues cuando se toma un tejido de una planta y se cultiva *in vitro*, ese tejido tiene la misma edad que tenía cuando estaba la planta. El rejuvenecimiento *in vitro* se produce al perder el tejido la señal que poseía la planta. Esta pérdida es más rápida a medida que el explante es más pequeño y se realizan más subcultivos *in vitro*. A medida que esto ocurre el tejido del cual se regeneran es más joven y por tanto sistemas de expresión de genes cambian. Estos sistemas en plantas obtenidas por esta vía vegetativa funcionan, mientras que en las plantas madres o generadoras no lo hacen. De esta forma en muchos cultivos las plantas propagadas vegetativamente *in vitro* se parecen más a las producidas por semillas (Pérez-Ponce 1998).

El rejuvenecimiento se manifiesta en la mayoría de las plantas o en todas las plantas regeneradas por igual y no se trasmite sexualmente. En el caso de los árboles, se señala con frecuencia ese tipo de variación en el material proveniente del cultivo *in vitro*. En manzanos, por ejemplo, la floración se retarda un año, pero en el segundo y tercer año las plantas micropropagadas superan la producción de las multiplicadas vegetativamente en 10 kilogramos por árbol (Pérez-Ponce 1998).

El rejuvenecimiento tiene un gran valor para la propagación masiva de plantas, pues por lo general incrementa el rendimiento y el desarrollo de las plantas. No obstante, el mayor vigor de las plantas micropropagadas no está dado solamente por el rejuvenecimiento, sino también por el saneamiento, causas que se hacen muy difícil de separar (Pérez-Ponce, 1998).

Hasta hace poco tiempo las causas de esos cambios genéticos durante el cultivo *in vitro* eran un misterio. Phillips *et al.* (1990) (citado por George, 1993), muestran avances de una hipótesis que plantea que los eventos mutagénicos ocasionados por el cultivo de tejidos están directamente o indirectamente relacionados con alteraciones en el estado de metilación del ADN. Cuando el ADN es altamente metilado la actividad de los genes es suprimida y una disminución de la metilación se correlaciona con un incremento de la actividad de esos genes.

Existen evidencias que la metilación del ADN y la metilación por la actividad de los elementos transposables, puede decrecer por el largo periodo de tiempo que puede ser mantenido el tejido de las plantas en cultivo (Kunze et al., 1988). Si lo encontrado tuviera validez, el

incremento de la actividad de los elementos transposable podría ser responsable de los cambios genéticos en callos y cultivos de células cuando ocurren periodos prolongados de incubación.

2.10.2 Variabilidad somaclonal.

Los clones de plantas regenerados a partir de callos fueron llamados por algún tiempo como calliclones y los originados a partir de protoplastos, protoclones (George, 1993). Larkin y Scowcroft (1981) propusieron el término de somaclon para describir las plantas originadas a partir de cualquier tipo de cultivo de tejido o células de origen somático. De esta forma la variación genética encontrada entre somaclones se denominó variación somaclonal. La variación que exista de forma natural en el tejido somático y que no interviene en la reproducción sexual, se elimina en este proceso, actuando de esta forma como filtro para la estabilidad de las especies de reproducción sexual.

2.10.3 Factores que influyen en la causa de la variación

En la estabilidad genética de las plantas procedentes del cultivo *in vitro* pueden influir varios factores. Dentro de estos se encuentran la variabilidad genética del cultivar o genotipo que va a ser propagado, el periodo de tiempo del cultivo, la composición del medio de cultivo, el tipo de explante que se utilizará, así como el grado de diferenciación de sus tejidos y la forma de regeneración a emplear (Smith, 1988).

En varias plantas ha quedado demostrado que las mutaciones cromosómicas aumentan proporcionalmente con la edad del cultivo *in vitro*. Se ha señalado que esta es la causa fundamental de la pérdida de la totipotencia de las células producto al elevado número de mutaciones, pues solo regeneran plantas las células con pequeños cambios. Estas son viables en menor proporción en plantas reproducidas sexualmente que en plantas de multiplicación vegetativa, las cuales son menos afectadas por la ganancia o pérdida de uno o varios cromosomas (Pérez-Ponce, 1998). En el género *Musa*, por ejemplo, una de las medidas para mantener la estabilidad genética es no producir más de 5 000 vitroplantas por explantes (Smith, 1988). La experiencia de la propagación en Cuba es que con 10 000 unidades es posible mantener la estabilidad genética que requiere la propagación (Pérez-Ponce, 1998).

Dentro de las formas de regeneración tenemos que el repique de los explantes en

segmentos más pequeños estimula la formación de yemas adventicias y por lo tanto un incremento de la variabilidad, mientras que el uso de yemas preformadas o totalmente diferenciadas disminuye la variabilidad (Pérez-Ponce, 1998).

2.11 Consideraciones finales.

Por todo lo anterior es evidente la necesidad de establecer sistemas de producción de guayabas, propagadas por medios vegetativos de cultivares seleccionados con un fin específico, que aseguren la formación de cultivos uniformes, altamente productivos y con frutos con características adecuadas a los requerimientos del mercado y la industria (Laura y Arango, 2001).

De acuerdo con toda la información consultada y revisada en este acápite se concluye que la guayaba (*P. guajava* L.) es un cultivo en el que la biotecnología, a través del cultivo de tejidos, brinda solución a algunos de sus principales problemas. No obstante, se reconoce que a pesar de que existen algunos protocolos de propagación *in vitro* en fase de implementación, éstos no se han valorado desde el punto de vista de su estabilidad genética, lo cual es una tarea que resulta indispensable.

Para conducir la misma se desarrolló el esquema experimental que se describe a continuación en el siguiente acápite.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.0 Diseño, montaje y atenciones culturales del experimento.

3.0.1 Ubicación del área de estudio.

El presente trabajo se desarrolló en la UCT “Juan Tomás Roig” perteneciente a la Universidad de Ciego de Ávila, como parte del proyecto CITMA territorial 00GC00215 “Propagación *in vitro* y transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens* de la guayaba Enana Roja Cubana EEA18-40”.

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Células y Tejidos en coordinación con el Laboratorio de Ingeniería Metabólica del Centro de Bioplantas. Como material vegetal se utilizó la variedad de guayaba (*Psidium guajava* L.) Enana Roja Cubana EEA 18-40.

3.0.2 Características de las plantas.

Se seleccionaron 48 plantas de guayaba provenientes de la propagación *in vitro* acorde al procedimiento propuesto por Nápoles (2003). Para ello se utilizaron yemas apicales obtenidas a partir de rebrotes de la raíz de plantas elites de guayaba var. Enana Roja Cubana EEA18-40 cultivadas en plantaciones productivas de la Empresa Cítricos Ceballos de la provincia de Ciego de Avila. Las yemas fueron colocadas bajo condiciones de cultivo *in vitro*, y una vez establecidas, los brotes fueron micropropagados mediante la técnica de segmentos nodales. Por último las vitroplantas fueron aclimatizadas y aviveradas en bolsas de nylon polietileno que contenían una mezcla de suelo ferralítico rojo y cachaza en proporción 2:1 (v/v). Cuatro meses después de salir del laboratorio las vitroplantas, con una altura aproximada de 30 cm, fueron transplantadas al campo para el montaje del experimento.

Adicionalmente se seleccionó otro grupo de 48 plantas, en este caso provenientes de estacas enraizadas en condiciones semicontroladas de casa de cultivo. Al igual que en el primer caso, tenían una altura promedio de unos 30 cm y estaban aviveradas en bolsas de nylon en iguales condiciones.

3.0.3 Plantación en campo y diseño experimental.

Ambos grupos se plantaron en condiciones de campo sobre un suelo ferralítico rojo con un marco de plantación de 4.50 x 1.00 m, para una densidad de siembra de 1481 plantas/ha, en

áreas de la Estación Experimental “Juan Tomás Roig” de la Universidad de Ciego de Ávila. Se utilizó un diseño de bloque al azar, con cuatro repeticiones conformadas por tres parcelas de cuatro plantas cada una. Las plantas se colocaron en dos surcos de 12 plantas cada uno. Para las evaluaciones fenológicas se muestrearon todas las plantas del experimento, mientras que para las evaluaciones bromatológicas se seleccionó al azar una planta de cada parcela.

3.0.4 Agrotecnia del cultivo.

Las labores realizadas fueron preparación de suelo, siembra, limpia de malezas, fertilización y cosecha. Todas estas se realizaron de acuerdo con el Instructivo Técnico para la guayaba Enana Roja Cubana (MINAGRI, 2004a).

Plantación y actividades culturales.

- **Despunte:** Como el fruto se produce en ramas nuevas, generalmente entre los nudos 2 y 4, posterior al 5 es poca la floración; se despunta para que salieran nuevos brotes.
- **Limpia de malezas:** Manual (guataquea) y mecanizada.
- **Fertilización:** Se le aplicó fórmula completa.
- **Riego:** Se le aplicó riego solo en el mes de Enero una vez por semana (aniego), manteniéndose los restantes meses en condiciones de secano.

3.1 Estudio fenológico.

Para llevar a cabo el estudio fenológico, las evaluaciones comenzaron cuando las plantas tenían tres meses de plantadas en el campo. Se iniciaron las evaluaciones el 11 de mayo del 2005 y se realizó la última evaluación el 11 de marzo del 2006, con una frecuencia semanal o mensual en dependencia del parámetro a evaluar. Estas evaluaciones estuvieron encaminadas a estudiar la fenología del cultivo (dinámica del crecimiento y desarrollo) de tipo de planta, así como su rendimiento. Para ello se midieron los parámetros siguientes:

- | | | |
|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| • Altura de la planta (m). | • Número de hojas/rama mayor. | • Plantas con botones (%). |
| • Diámetro de la copa (m). | • Números de botones/planta. | • Plantas con flores (%). |
| • Diámetro del tronco (cm). | • Números de flores/planta. | • Plantas con frutos (%). |
| • Longitud rama mayor (cm). | • Números de frutos/planta. | |

3.1.1 Operaciones de medición.

La altura de la planta se midió, partiendo del tronco colocando la regla graduada en

centímetro de forma vertical hasta alcanzar la mayor altura de la planta.

El diámetro de la copa se midió, colocando la regla de forma horizontal en el centro de la planta midiéndose la mayor longitud alcanzada por las ramas a ambos lados. Para esta operación fue necesaria la utilización de dos operarios.

El diámetro del tronco se midió con un pie de rey a la altura de 10 cm de la superficie del suelo.

Los botones se contaron en toda la planta, se consideró el botón floral desde la fase I hasta la fase IV según la clasificación realizada por (Marrero *et al.* 1997). Las flores se contaron en todo el árbol, se consideraron flores cuando estaban totalmente abiertas de forma tal que se le pudieran observar todos sus vértices florales. Los frutos se contaron directamente en toda la planta. Se consideraron los frutos según la clasificación de (Marrero *et al.* 1997), donde se exponen cuatro fases. Se cuantificaron los frutos a partir de la fase I hasta la fase IV.

Las evaluaciones en los botones, flores y frutos, se mantuvieron hasta comenzar la cosecha, después de esta se detuvo la evaluación de estos indicadores. La clasificación empleada por (Marrero *et al.* 1997) solo se utilizó con el objetivo de identificar los botones y los frutos.

El peso de los frutos se realizó en gramos, con ayuda de una balanza técnica con la mayor rapidez posible después de la cosecha para evitar alteración en la evaluación. Los frutos se cosecharon en estado de madurez fisiológica.

3.2 Análisis bromatológico.

Para lograr la caracterización bromatológica de ambos tipos de plantas se llevaron a cabo evaluaciones de diferentes parámetros al fruto durante cada periodo de cosecha. Estos indicadores fueron de carácter físicos (cuantitativos y cualitativos) y químicos.

3.2.1 Caracteres físicos cuantitativos.

Los caracteres físicos cuantitativos evaluados son los siguientes:

- Peso promedio del fruto (g).
- Diámetro polar del fruto (cm).
- Diámetro ecuatorial del fruto (cm).
- Diámetro de la base de la corola (cm).
- Diámetro cavidad del cáliz (cm).
- Grosor del mesocarpio (cm).
- Cantidad de semillas por fruto.
- Peso semillas por fruto (g)
- Peso de 100 semillas (g).

3.2.2 Caracteres físicos cualitativos.

Los caracteres físicos cualitativos evaluados son:

- Forma del fruto (Según escala: 1 redondo, 2 ovoide, 3 forma de pera).
- Forma extremo peduncular (Según escala: 1 ampliamente redondeado, 2 redondeado, 3 truncado, 4 acentuado, 5 aguzado).
- Relieve superficial del fruto (Según escala: 1 liso, 2 rugoso, 3 irregular).
- Color de la piel del fruto (Según escala: 1 amarillo, 2 verde-amarillo, 3 verde).
- Color de la pulpa del fruto (Según escala: 1 blanco, 2 crema, 3 rosado pálido, 4 rosado, 5 rosado oscuro, 6 rosado naranja, 7 naranja).
- Uniformidad del color de la pulpa (Según escala: 0 no uniforme, 1 uniforme)
- Número de carpelos

3.2.3 Caracteres químicos.

Los caracteres químicos evaluados acorde a las Normas Cubanas (1982) son:

- Sólidos solubles totales (°Brix) Refractómetro de mano según NC 77-22-4 (1982)
- pH Directamente en un pH-metro según NC 77-22-1 (1982).
- Acidez total titulable (%) Según NC 77-22-7 (1982).
- Ácido ascórbico (mg/100 g de pulpa) Según NC 77-22-16 (1982).

3.3 Procesamiento estadístico:

En el procesamiento estadístico de los resultados se emplearon las pruebas estadísticas de Kolmogorov-Smirnov y el Test Levene para comprobar los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianza de los datos respectivamente. También se utilizó la prueba paramétrica de Análisis de Varianza (ANOVA), Tukey y T-student. En todos los casos se utilizó el procesador estadístico SPSS 11.5.0 sobre Windows (Copyright[©] SPSS Inc., 1998-2002) y para la graficación de los resultados el Microsoft[®] Office Excel 2003 (Copyright[©] 1985-2003).

3.4 Datos climáticos de la región.

Las condiciones climáticas de la región donde está enmarcada la plantación fueron monitoreadas por el Centro Provincial de Meteorología en Ciego de Ávila, el cual permitió adquirir los datos climáticos que se exponen en la figura 1. Estos valores tienen una frecuencia decenal y reflejan el comportamiento de la temperatura, la humedad relativa y las precipitaciones durante el período de las evaluaciones del experimento.

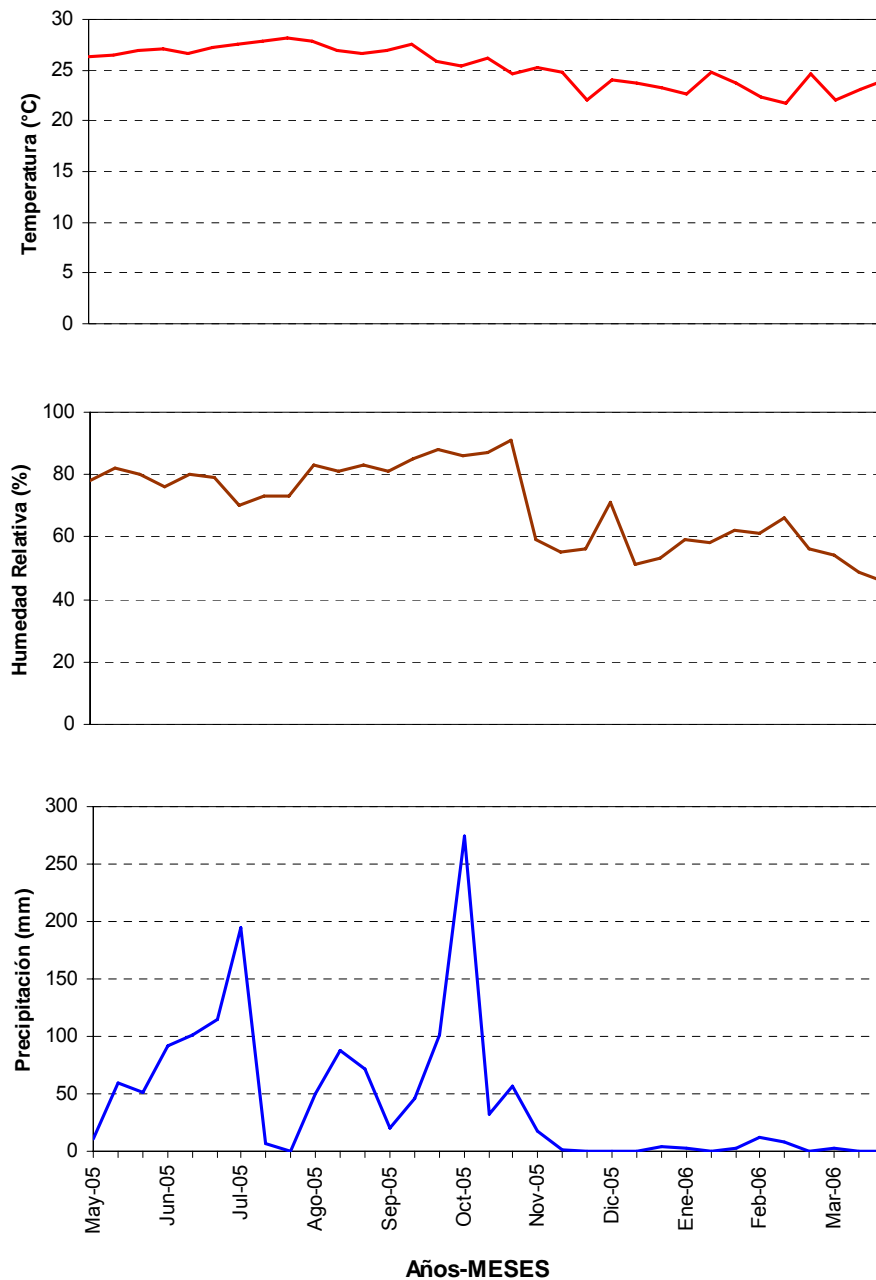


Figura 1. Distribución decenal de la temperatura media, la humedad relativa y las precipitaciones para la región de Modesto Reyes durante el año 2005 y parte del 2006. [Fuente: INSMET, Centro Meteorológico Provincial, Ciego de Avila].

1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

4.1 Estudio fenológico.

En la tabla 1 se muestra el resultado de la comparación entre las plantas de guayaba var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 procedentes del cultivo *in vitro* (vitroplantas) y del enraizamiento de esquejes (estacas), en función de las principales variables fenológicas del cultivo. La misma resume la información total de 11 meses de evaluación comprendidos entre mayo del 2005 y marzo del 2006.

Tabla 1. Comparación entre plantas de guayaba var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 procedentes del cultivo *in vitro* (vitroplantas) y del enraizamiento de esquejes (estacas), de acuerdo a las principales variables fenológicas del cultivo.

VARIABLES (UM)	Tipo de planta	Media	DV	ES	CV (%)	Significación T-student
Altura de la copa (cm)	Vitroplanta	119.91	41.93	1.622	0.352	ns
	Estaca	118.15				
Diámetro de la copa (cm)	Vitroplanta	139.27	61.89	2.395	0.442	ns
	Estaca	140.60				
Diámetro del tronco (cm)	Vitroplanta	3.01	1.16	0.045	0.384	ns
	Estaca	3.05				
Relación Longitud rama : No. Hojas por rama	Vitroplanta	3.84 a	1.85	0.197	0.644	***
	Estaca	1.91 b				
No. Botones / planta (u)	Vitroplanta	4.79 b	13.23	0.558	1.431	**
	Estaca	10.57 a				
No. Flores / planta (u)	Vitroplanta	2.61	2.47	0.162	0.908	ns
	Estaca	3.07				
No. Frutos / planta (u)	Vitroplanta	6.10 b	9.20	0.241	1.281	***
	Estaca	7.80 a				
Promedio plantas con botones (%)	Vitroplanta	11.0 b	20.17	2.562	0.896	***
	Estaca	34.1 a				
Promedio plantas con flores (%)	Vitroplanta	6.4 b	10.70	1.359	1.012	*
	Estaca	14.8 a				
Promedio plantas con frutos (%)	Vitroplanta	42.8 b	21.2	2.690	0.356	***
	Estaca	76.1 a				

(Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según prueba paramétrica de T- student, para $p \leq 0.05$ y $n = 345$. DV: desviación típica, ES: error típico de la media, CV: coeficiente de variación, ns: no significativo).

En sentido general se puede observar que no existen diferencias significativas en cuanto a las variables relacionadas con el tamaño del árbol (altura de la planta, diámetro de la copa y diámetro del tronco). Sin embargo, con respecto a la relación longitud de la rama: número de hojas por rama, se aprecia que las vitroplantas superan significativamente a las plantas de

estaca. Esto indica que para las vitroplantas las hojas están más distanciadas unas de otras en su posición en la rama. Mientras que para las plantas provenientes de estacas enraizadas los entrenudos son significativamente más cortos. Esta característica puede estar asociada con un mayor vigor en el crecimiento de las vitroplantas con respecto a las estacas, propias del rejuvenecimiento adquirido por las primeras durante la propagación *in vitro*.

No obstante ese rejuvenecimiento mostrado por las vitroplantas, el comportamiento de las variables de crecimiento en el tiempo (figura 2, 3 y 4), refleja el desarrollo de curvas con características similares para ambos tipos de plantas. Ese desarrollo no alcanza un valor máximo estabilizado en el tiempo, lo cual indica que aún las plantas (ambos grupos) se mantienen en crecimiento. El análisis estadístico de comparación de las medias (ANOVA) no muestra diferencias significativas para ambos grupos de plantas para cada uno de los momentos evaluados. Sin embargo, para momentos de evaluación diferentes, las medias fueron significativamente desiguales según $p < 0.05$. Solo para el caso del diámetro del tronco, en la primera evaluación, se observa una diferencia significativa entre ambos grupos de plantas. Esto se debe a que en ese momento las estacas poseen un tallo más grueso que las vitroplantas, debido fundamentalmente al grosor preexistente que tiene el segmento de tallo (estaca) utilizado como propágulo vegetativo.

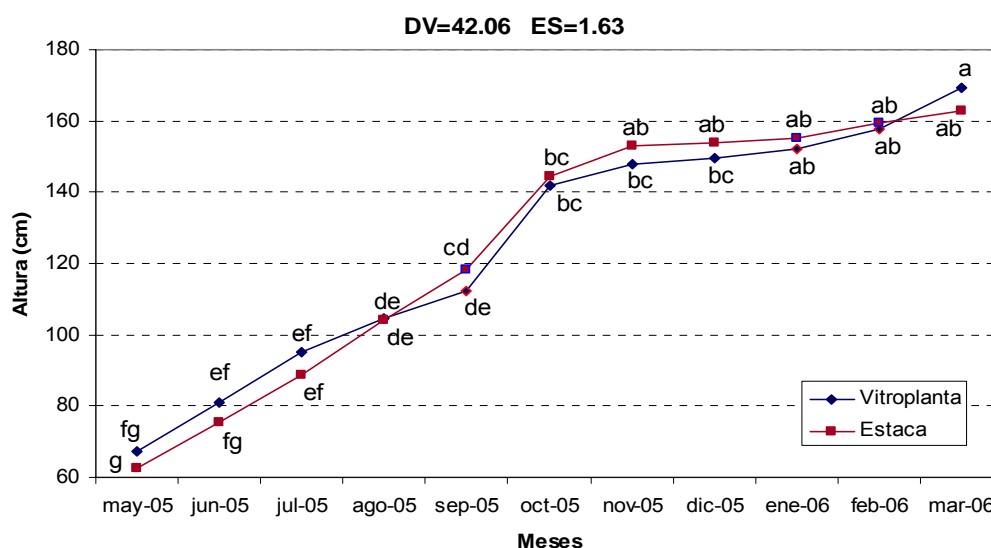


Figura 2. Comportamiento de la altura de la copa de las plantas de guayaba var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 provenientes del cultivo *in vitro* (vitroplantas) y del enraizamiento de esquejes (estacas) durante 11 meses de evaluación. (Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según prueba paramétrica de ANOVA multivariado y Tukey HSD, para $p \leq 0.05$, DV: desviación típica, ES: error típico media).

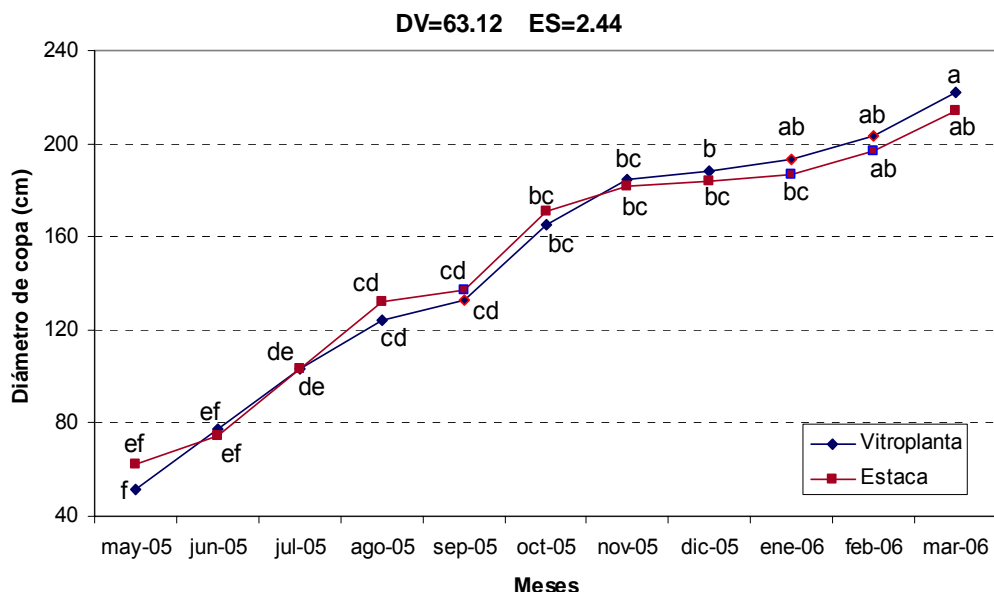


Figura 3. Comportamiento del diámetro de la copa de plantas de guayaba var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 provenientes del cultivo *in vitro* (vitroplantas) y del enraizamiento de esquejes (estacas) durante 11 meses de evaluación. (Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según prueba paramétrica de ANOVA multivariado y Tukey HSD, para $p \leq 0.05$. DV: desviación típica, ES: error típico de la media).

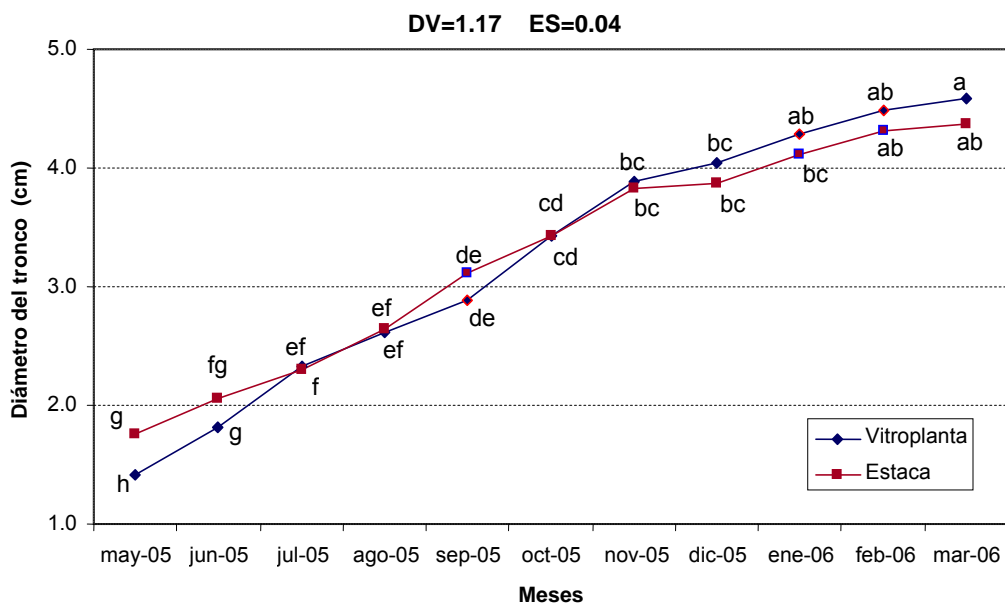


Figura 4. Comportamiento del diámetro del tronco de plantas de guayaba var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 provenientes del cultivo *in vitro* (vitroplantas) y del enraizamiento de esquejes (estacas) durante 11 meses de evaluación. (Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según prueba paramétrica de ANOVA multivariado y Tukey HSD, para $p \leq 0.05$. DV: desviación típica, ES: error típico de la media).

La altura final de las plantas en ambos grupos está muy por debajo de la señalada en la literatura para el cultivar EEA 18-40 donde se señala una altura promedio aproximada de 2.7m (Peña *et al.*, 1996). No obstante, existe un factor que determina esta diferencia y es el hecho de la edad del cultivo. Este experimento fue evaluado a partir de los tres meses de plantados en el campo y cuando se terminó la evaluación solo tenían un año y dos meses. Si se comparan estos resultados con otros cultivares, de más de 5 años de edad como son los casos de la Belic L-97 con 4 m y el cultivar N-6 con 3 m (Peña *et al.* 1996), las alturas todavía son mucho menores. Por ello se puede inferir que ambos grupos de plantas manifiestan de forma general un porte bajo.

El crecimiento anual del diámetro de la copa tiene importancia práctica en la determinación del intervalo de poda, porque da la medida de que hay mayor crecimiento del árbol, aspecto que reduce el espacio libre entre hileras de plantas. De estos resultados se infiere que en ambos grupos en estudio los periodos de podas requeridos son cortos y similares al cultivar EEA 18-40 (Martínez, 1998).

El incremento anual del tamaño del tronco es estable en toda la época del año pero en los meses de lluvia aumenta considerablemente, especialmente en el cultivar EEA 18-40 (Martínez, 1998). Si se observa el planteamiento anterior y se tienen en cuenta las condiciones climáticas bajo las cuales se desarrolló el experimento, es justificable el hecho del cambio de pendiente que experimentan las curvas del diámetro del tronco de ambos grupos de plantas a partir del mes de noviembre/2005, momento a partir del cual se intensifica la sequía en la región (figura 1).

El mayor vigor de las plantas micropropagadas puede estar dado por el rejuvenecimiento que se obtiene a través del cultivo *in vitro*, el cual por lo general incrementa el desarrollo de las plantas y el rendimiento de las cosechas (Pérez-Ponce, 1998).

Para las variables número de botones y número de frutos por planta (tabla 1) se aprecia un resultado significativamente superior en los árboles provenientes de estacas enraizadas. De igual forma ocurre para las variables: número de plantas con botones, flores y frutos. En este caso la precocidad característica de la variedad EEA 18-40 (Peña *et al.*, 1996), se puso de manifiesto en las plantas provenientes de estacas, no así en las procedentes del cultivo *in vitro*. Este fenómeno constituye un efecto directo del rejuvenecimiento de las plantas

provocado por la propagación y cultivo in vitro.

En cuanto al número de flores por planta, los resultados fueron estadísticamente similares para ambos tratamientos. Las características de la biología floral de la guayaba explican este resultado.

De acuerdo con Caraballo (2001), la yema floral que aparece en la axila de las hojas demora entre 27-41 días promedio (según la variedad) desde que se hace visible hasta su completo desarrollo en el momento de la antesis. La apertura floral ocurre a partir de las 4:30 AM hasta las 8:30 AM, momento durante el cual ocurre prácticamente la dehiscencia de las anteras en el 100% de las flores, demostrando la ocurrencia de autopolinización en una alta frecuencia. Este hecho provoca que el tiempo de duración de la flor abierta (la cual fue cuantificada durante el estudio) sea de solo aproximadamente 24 horas, lo cual trae consigo un comportamiento del número de flores por planta, inestable en el tiempo (figura 5). Para Marín *et al.* (2000) en un estudio del comportamiento de tipos de guayaba injertados sobre *P. friedrichsthalianum*, las plantas mostraron botones florales por un período de 15 a 45 días, flores de 15 a 30 días y frutos cuajados durante todo el período de la evaluación.

En la figura 5 también se muestra el comportamiento del número de botones y frutos por planta para cada tratamiento en estudio. En ellos se observa como a partir de la semana 24 de evaluación, las cantidades de botones, flores y frutos por planta se incrementan de manera acelerada en cada caso, no obstante para las plantas de estaca el incremento es muy superior al de las vitroplantas.

Adicionalmente a la evaluación de la cantidad de estas estructuras por planta, también se cuantificó el número de árboles que se encontraban con botones, flores y frutos en el momento de la evaluación, y se calculó el porcentaje que representaba ese valor con respecto al total de plantas para cada tratamiento (figura 6). Como se puede apreciar los porcentajes de plantas con botones, flores y frutos son superiores en las plantas provenientes de estacas enraizadas. En el caso de botones y flores el comportamiento es muy variable, mientras que para los frutos es muy alto (70-100%) y estable durante todo el período de evaluación.

Las vitroplantas por su parte muestran un bajo porcentaje de expresión de su madurez fisiológica, si se tiene en cuenta que la emisión de órganos florales es el principal indicador

del cambio fisiológico de un estado juvenil a un estado maduro en los árboles (Rodríguez *et al.*, 2005). Este comportamiento, además de ser bajo, manifiesta fluctuaciones menos acentuadas para el caso de botones y flores, que para los frutos, donde se observa una disminución a partir de la decimosexta evaluación, lo cual se relaciona con la caída de frutillos por limitaciones en el cuaje. Esta disminución continúa hasta la evaluación 26 donde se reinicia un incremento en el número de plantas con frutos, que alcanza en la última evaluación un máximo del 67.3%. En este grupo de plantas, las características juveniles son más acentuadas como resultado del sistema de propagación *in vitro* al que fueron sometida y por ello se producen estos resultados.

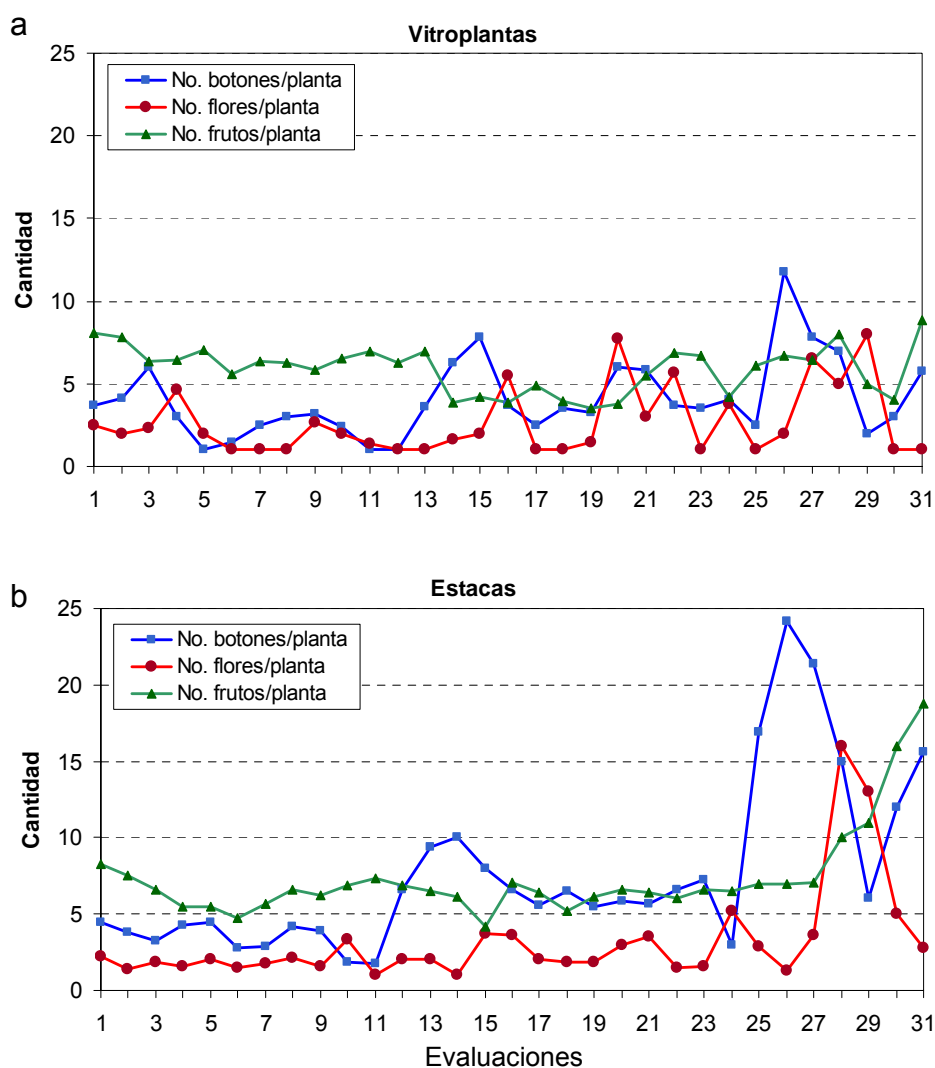


Figura 5. Comportamiento del número de botones, flores y frutos por planta durante el período de evaluación de las plantas de guayaba cultivadas *in vitro* (vitroplantas) y las plantas del enraizamiento de esquejes (estacas).

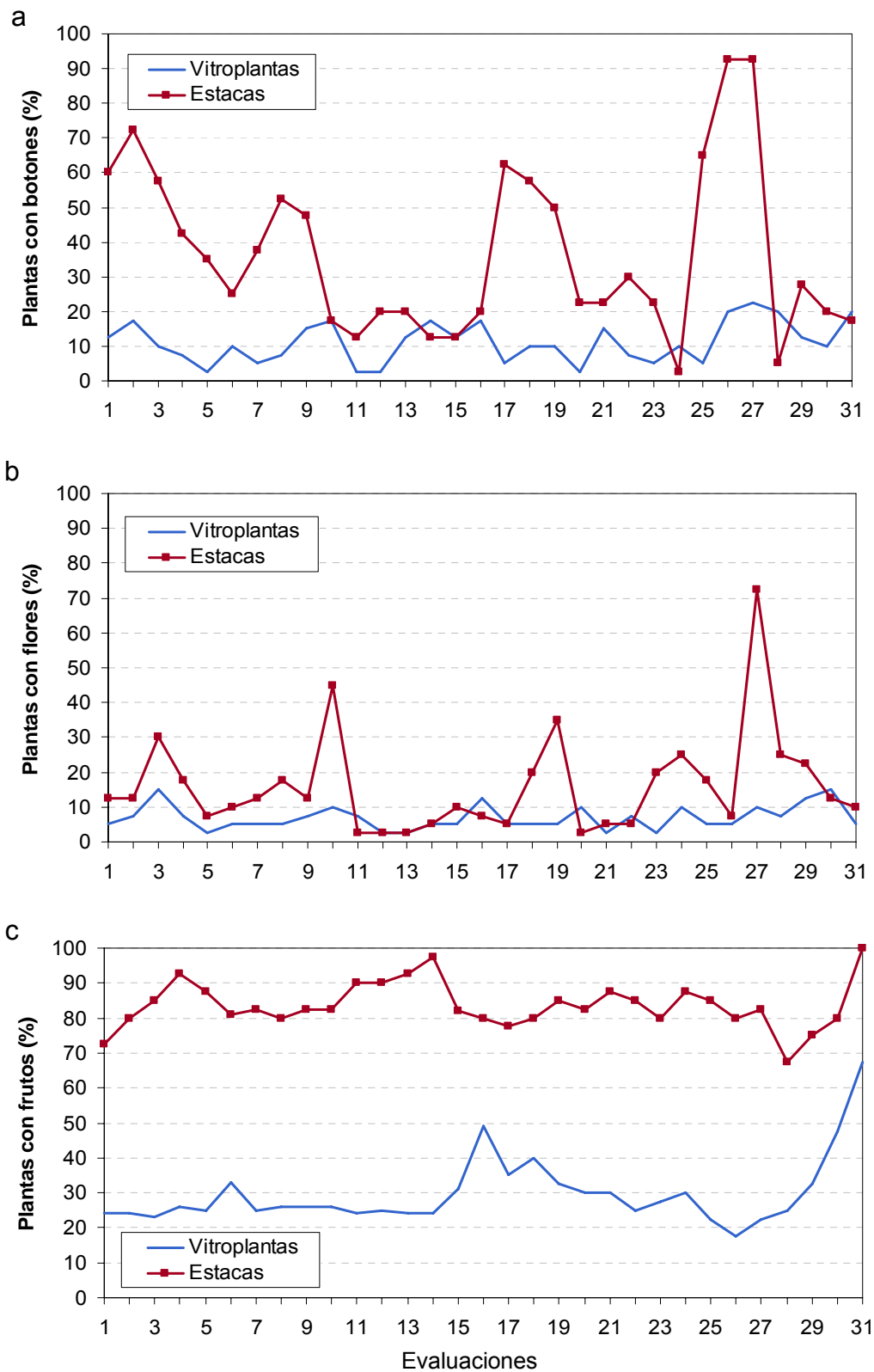


Figura 6. Comportamiento del porcentaje de plantas con botones (a), plantas con flores (b), y plantas con frutos (c), durante el período de comparación entra los árboles de guayaba provenientes del cultivo *in vitro* (vitroplantas) y del enraizamiento de esquejes (estacas).

A pesar de este primer acercamiento en la explicación de los resultados anteriores, para una correcta interpretación de los mismos, es necesario un análisis interrelacionado de las figuras 5 y 6.

En el caso de los árboles de estaca a pesar de que se observan altos porcentajes de plantas que poseen botones, flores y frutos (figura 6), las cantidades promedio de éstos órganos por planta son inferiores a 10 (figura 5b). Este comportamiento se mantiene hasta alrededor de la vigésimo cuarta evaluación, momento a partir del cual esas cantidades se incrementan. Este aspecto ejemplifica la precocidad característica de la variedad EEA 18-40 (Peña *et al.*, 1996), no obstante demuestra también que la producción en esta etapa no es aún relevante.

En los árboles procedentes de la propagación *in vitro* los porcentajes de plantas que poseen botones, flores y frutos son más bajos (figura 6), al igual que las cantidades de estos órganos por planta (figura 5a). No obstante, en este último y a partir de la evaluación 24 (figura 5a), se observa un ligero incremento. Este se produce especialmente en el número de botones por planta, el cual alcanza un promedio máximo de 11.8, valor que está muy por debajo del máximo alcanzado por las plantas de estaca (figura 5b).

De acuerdo con Peña *et al.* (1996) y Martínez (1998), bajo las condiciones de Cuba existen dos picos florales. El primero y de mayor intensidad, se origina en los meses de Marzo - Abril y los frutos son cosechados en mayor volumen en los meses de Agosto – Septiembre; estos frutos son de menor calidad y dulzor. El segundo es de menor intensidad, se origina al inicio del invierno, en los meses de Octubre - Noviembre y los frutos son cosechados en mayor volumen en los meses de Marzo – Abril y son de mayor calidad y dulzor. En este estudio el pico de cosecha aprovechable fue el segundo que se caracterizó por ser de un bajo rendimiento para ambos tipos de plantas. No obstante, las estacas con un rendimiento de 11.6 kg/árbol, superaron significativamente a las vitroplantas (6.49 kg/árbol).

Según Araujo (1999), en la Florida árboles de guayabo de 2 años de edad producen alrededor de 14 Kg de frutas, llegando a producir a los 4 años de edad hasta 225 Kg de frutos/año. En el presente estudio los resultados son bajos si se tiene en cuenta que los árboles tienen 1 año y 2 meses de plantados en el campo en condiciones experimentales. Sobre estos resultados de rendimiento influyeron sin dudas las condiciones climáticas

ocurridas en el periodo, en especial la intensa sequía.

Durante el crecimiento de los frutos el papel del agua es fundamental. Vázquez y Torres (1995) aseguran que en esta etapa se requieren grandes cantidades de materias alimenticias que deben ser trasladadas desde otras partes de la planta, fundamentalmente de las hojas y los tallos. Además el agua constituye el solvente natural de las plantas para el movimiento de todos los solutos en ellas (Salisbury y Ross, 1992). De ahí las afectaciones registradas en la producción, rendimiento e incluso en el crecimiento de los árboles (aspecto señalado anteriormente).

El papel del agua como factor indispensable para el crecimiento de las plantas es bien conocido. Un estrés hídrico fuerte altera la actividad metabólica de los principales procesos fisiológicos. Trae consigo una disminución de la actividad fotosintética, una inhibición del crecimiento de los tallos, la disminución de la absorción de sales minerales por las raíces, la disminución de la cantidad de fitohormonas que estimulan el crecimiento y un aumento de la cantidad de los inhibidores. Por tanto las células que se forman son más pequeñas, muy xerófilas y más tolerantes a la sequía, con una disminución en la síntesis de ATP y una acumulación de ácidos orgánicos en las células que inhiben el ciclo de Krebs (Vázquez y Torres, 1995).

4.2 Análisis bromatológico.

En la tabla 2 se exponen las principales características bromatológicas cualitativas de los frutos, observadas en el estudio comparativo entre las vitroplantas y las estacas. Para exponer los resultados de las variables forma del fruto, forma del extremo peduncular, relieve superficial, color de la piel, color de la pulpa, uniformidad del color de la pulpa y número de carpelos, se utilizó como estadígrafo de tendencia central la moda. Este permite conocer el valor que posee mayor frecuencia relativa y por tanto aquel que más se repite en el estudio.

De esta forma se concluye que los frutos de las plantas propagadas por cultivo *in vitro* y las plantas provenientes de estacas enraizadas poseen características cualitativas similares, las cuales además coinciden con las citadas por Peña *et al.* (1996), quienes plantean que la guayaba Enana Roja Cubana EEA 18-40 se caracteriza por presentar un fruto de forma

ovoide, piel lisa y color amarillo. Estas variables se consideran de gran importancia, pues le atribuyen a la fruta un atractivo valor comercial. Martínez (1983), señala que la fruta cítrica adquiere mayor valor cuando su apariencia externa denota colores amarillos – naranja aunque los valores internos sean menos aceptables.

Tabla 2. Principales características físicas cualitativas del fruto de guayaba var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 observadas durante el estudio bromatológico comparativo entre plantas provenientes del cultivo *in vitro* (vitroplanta) y del enraizamiento de esquejes (estaca).

Tipo de planta	Forma	Forma del extremo peduncular	Relieve superficie	Color piel	Color pulpa	Uniformidad color pulpa	No. carpelos
VITROPLANTA	Ovoide	Redondeada	Liso	Amarillo	Rosado oscuro	Si	5
ESTACA	Ovoide	Redondeada	Liso	Amarillo	Rosado oscuro	Si	5
DV	0.00	0.00	0.364	0.00	0.493	0.00	0.192
ES	0.00	0.00	0.035	0.00	0.047	0.00	0.018
CV (%)	0.0	0.0	0.315	0.0	0.436	0.0	0.038

(DV: desviación típica, ES: error típico de la media, CV: coeficiente de variación).

El color de la pulpa del fruto es otro de los indicadores que tiene gran importancia desde el punto de vista de su valor comercial. De acuerdo con Laura y Arango (2001), para la industria se prefieren frutos de color rosa intenso, lo cuales implican un ahorro en colorantes y mayor contenido de azúcares. En este estudio las variaciones observadas en este indicador mostraron frutos de color rosado en diferentes tonalidades con un bajo coeficiente de variación.

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos a partir de la evaluación bromatológica de los caracteres cuantitativos de los frutos cosechados a partir de plantas provenientes del cultivo *in vitro* (vitroplanta) y del enraizamiento de esquejes (estaca).

En sentido general existe una gran similitud entre los frutos cosechados de uno y otro grupo de plantas. Con excepción del diámetro de la base de la corola, el cual fue significativamente superior en las vitroplantas, en el resto de las variables no se muestran diferencias estadísticas relevantes.

La superioridad del diámetro de la base de la corola en las vitroplantas con respecto a las plantas de estaca, puede estar asociada a una ligera mayoría en el tamaño de los frutos (peso, diámetro polar y ecuatorial) de las primeras.

Tabla 3. Principales características físicas cuantitativas del fruto de guayaba var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 observadas durante el estudio bromatológico comparativo entre plantas provenientes del cultivo *in vitro* (vitroplanta) y del enraizamiento de esquejes (estaca).

Variables (UM)	Tipo de planta	Media	DV	ES	CV (%)	Significación T-student
Peso fruto (g)	Vitroplanta	153.16	48.36	5.042	0.329	ns
	Estaca	143.73				
DP: diámetro polar (cm)	Vitroplanta	6.33	0.828	0.086	0.134	ns
	Estaca	6.10				
DE: diámetro ecuatorial (cm)	Vitroplanta	6.48	0.716	0.075	0.115	ns
	Estaca	6.12				
Relación DP:DE	Vitroplanta	0.980	0.061	0.006	0.062	ns
	Estaca	0.995				
Diámetro base corola (cm)	Vitroplanta	1.47 a	0.264	0.028	0.193	***
	Estaca	1.31 b				
Diámetro cavidad cáliz (cm)	Vitroplanta	3.92	0.455	0.047	0.119	ns
	Estaca	3.76				
Grosor mesocarpio (cm)	Vitroplanta	2.56	0.549	0.057	0.226	ns
	Estaca	2.36				
No. semillas / fruto (u)	Vitroplanta	281	93.52	16.532	0.362	ns
	Estaca	236				
Peso semillas / fruto (g)	Vitroplanta	2.75	0.907	0.160	0.362	ns
	Estaca	2.26				
Peso 100 semillas (g)	Vitroplanta	0.99	0.252	0.045	0.249	ns
	Estaca	1.03				

(Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según prueba paramétrica de T- student, para $p \leq 0.05$. DV: desviación típica, ES: error típico de la media, CV: coeficiente de variación, ns: no significativo).

Entre los indicadores más valorados por los consumidores en Cuba se encuentran aquellos relacionados con el tamaño de la fruta. Las frutas cosechadas en este estudio se clasifican como frutos de mediano a grandes, lo cual coincide con lo señalado por Peña *et al.* (1996), en la descripción de la variedad EEA 18-40.

Para el peso del fruto, si se comparan estos resultados con otros que aparecen en la literatura, se reconoce que las variaciones coinciden de forma general con lo señalado por otros investigadores quienes aseguran que oscila entre 60 – 500 g (Laguado *et al.*, 1999; Morales y Rodríguez, 2000).

Para las condiciones de Cuba se realizó un estudio con 10 cultivares de guayabo, en el cual se informa que el peso de los frutos puede variar entre 150 - 500g (González *et al.*, 1985). Por otra parte existen otros autores que plantean que para que el fruto tenga la calidad requerida para el consumo fresco y la industria debe tener un peso promedio entre 200-350 g (Laura y Arango, 2001).

Si se tienen en cuenta los datos recogidos en el Instructivo Técnico desarrollado por el Ministerio de la Agricultura para el cultivo de la guayaba var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 (MINAGRI, 2004a), donde se reconoce que dentro de las características botánicas del fruto en esta variedad su peso puede alcanzar un máximo de 400 g, se entiende que el promedio en este estudio es medio.

Para el diámetro polar y ecuatorial del fruto, los resultados coinciden con los obtenidos por González *et al.*, (1985) quienes señalan que los frutos presentan medias generales entre 6 y 7 cm.

Según Laura y Arango (2001) los productores de distintos países tienen como criterio a la hora de seleccionar frutos, que estos tengan un grosor del mesocarpio mayor de 1.5 cm. Como se puede apreciar en la tabla 3 los valores obtenidos sobrepasan los encontrados en la literatura. En estudios realizados en Cuba con la variedad EEA 18-40 bajo la influencia de diferentes dosis de fertilizantes sobre el rendimiento y calidad del fruto durante varios años encontró que el grosor del mesocarpio alcanzaba un promedio de 1.06 cm sin diferencias significativas en los tratamientos (Rodríguez *et al.*, 1990), valor que se encuentra muy por debajo de los resultados de este trabajo.

Para el caso del número de semillas por frutos, si se comparan los resultados obtenidos con la literatura consultada se puede decir que estos valores están dentro del rango planteado que se enmarca entre 100-500 semillas/frutos (MINAGRI, 2004a). La información sobre el peso de las semillas no es abundante. No obstante se asegura que existe una preferencia de frutos con menos del 2% del peso total (Laura y Arango, 2001). En este trabajo el peso de las semillas representan el 1.79 y 1.57% del peso total del fruto, para las plantas provenientes del cultivo *in vitro* y del enraizamiento de esquejes, respectivamente.

Con respecto a las principales características químicas de los frutos cosechados (tabla 4) se pudo comprobar un comportamiento similar a los casos anteriores. En ninguna de las variables utilizadas para la comparación entre las plantas procedentes del cultivo *in vitro* y del enraizamiento de esquejes, se observaron diferencias estadísticas significativas. Esto sugiere que el método de propagación por cultivo *in vitro* no produce variaciones sensibles en los indicadores químicos, los cuales constituyen elementos importantes de la calidad del fruto y de mucho valor dietético (Saltos *et al.*, 2003).

Con excepción de la acidez titulable, los resultados obtenidos en las restantes variables

evaluadas, se mantienen dentro de los rangos señalados para la especie en diversos estudios relacionados con la composición química de los frutos de guayaba (González *et al.*, 1985; Laguado *et al.*, 1999; Morales y Rodríguez, 2000; Saltos *et al.*, 2003).

Tabla 4. Principales características químicas de los frutos de la guayaba var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 cosechados en el estudio bromatológico comparativo entre plantas procedentes del cultivo *in vitro* (vitroplanta) y del enraizamiento de esquejes (estaca).

VARIABLES (UM)	Tipo de planta	Media	DV	ES	CV (%)	Significación T-student
Sólidos Solubles Totales (°Brix)	Vitroplanta	8.69	1.356	0.226	0.152	ns
	Estaca	9.20				
pH	Vitroplanta	4.26	0.186	0.031	0.043	ns
	Estaca	4.34				
Acidez (%)	Vitroplanta	0.17	0.030	0.005	0.178	ns
	Estaca	0.16				
Vitamina C	Vitroplanta	381.71	98.905	16.484	0.240	ns
	Estaca	444.12				

(Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según prueba paramétrica de T- student, para $p \leq 0.05$. DV: desviación típica, ES: error típico de la media, CV: coeficiente de variación, ns: no significativo).

La guayaba es una de las frutas tropicales más importantes desde el punto de vista dietético (Morales y Rodríguez, 2000), pues se considera como un fruto hipocalórico, que puede ser consumido por todo tipo de personas sin provocar alteraciones en su metabolismo (Saltos *et al.*, 2003).

El contenido de vitamina C o ácido ascórbico resulta quizás el componente químico que despierta mayor interés en la fruta de la guayaba, pues sus valores superan a numerosas frutas cítricas. Saltos *et al.* (2003) señalan un elevado contenido de vitamina C con valores superiores a los 455 mg/100 g de pulpa. Otros autores aseguran que en varios países coinciden en valorar contenidos de vitamina C entre 200 y 300 mg/100 g de pulpa como satisfactorios (Laura y Arango, 2001).

Esta sustancia reviste una gran importancia por ser utilizada ampliamente en la medicina, ya que está involucrada en distintas reacciones químicas dentro del organismo entre ellas se encuentran aquellas relacionadas con el mecanismo de la cicatrización, con la activación de los sistemas enzimáticos para la detoxificación hepática, participa también en la activación del sistema inmunológico, incrementa la absorción del hierro y posee un efecto anti-

cancerígeno (Llorente, 2004). No obstante el resto de las variables son también importantes en la evaluación de la calidad del fruto.

Según Laguado *et al.* (1999), en trabajos realizados sobre las características físico-químicas de frutos de guayaba del tipo Criolla Roja y San Miguel, se obtuvo que tenían valores en el índice de:

pH : Criolla Roja : 3,88 – 4,22; San Miguel: 3,97 – 4,7

SST: Criolla Roja: 5 – 8,5; San Miguel: 4 – 7,9 ° Brix

Acidez: Criolla Roja: 0,40 - 0,58; San Miguel: 0,36 – 0,53 %

Quijada *et al.* (1999), en análisis químicos realizados a frutos de la variedad Criolla Roja determinaron variaciones en el pH de 4,20 – 4,34, en los SST de 7,6 – 9,06 y en la Acidez titulable de 0,33 – 0,44 %. Según Laura y Arango (2001), para frutos de mesa se buscan guayabas de tipo dulces con una acidez total de 0.15% a 0.35%, mientras que para la industria se emplean tipos ácidos con 1.5% a 2.5% porque permiten una mejor conservación y control de la calidad.

Para las condiciones de Cuba se realizó un estudio con 10 cultivares de guayaba con vistas al mejoramiento (González *et al.*, 1985). En éste se informa que el pH de estos frutos osciló entre 4.53 y 4.18, obteniéndose los mayores valores con la variedad EEA 18-40, Belic L 2-97 y la EEA 27. La acidez titulable varió entre 0.31-0.38%, con un registro promedio de 0.37% para la EEA 18-40.

La posible causa de que los valores de la acidez titulable en este trabajo estén por debajo de los señalados en la literatura, puede estar asociado a las intensas condiciones de sequía bajo las cuales se desarrollaron los frutos.

Según Saltos *et al.* (2003), el contenido de sólidos solubles aumenta mientras el fruto va desarrollándose, alcanzando valores de 9.6 ± 0.7 al término de su desarrollo. Conforme aumenta el contenido de sólidos solubles disminuye el porcentaje de acidez, siendo este comportamiento el responsable de proporcionar a la guayaba el sabor característico. Este incremento en sólidos solubles es fundamentalmente debido al contenido en azúcares, que en la madurez óptima es de alrededor de 4 g/ 100 g de pulpa.

De acuerdo con Peña *et al.* (1996), esta cosecha se corresponde con el período floral de Octubre-Noviembre, donde se obtienen los frutos de mayor dulzor en el período Marzo-Abril.

Este período, en función de la figura 1, transcurrió con precipitaciones muy escasas, baja humedad relativa y bajas temperaturas, todo lo cual asegura una alta conversión de azúcares y por tanto un sabor más dulce de las guayabas. Esta disminución de la acidez titulable afectó a las vitroplantas y a las estacas, lo cual refuerza los planteamientos anteriores y descarta un efecto negativo del método de propagación por cultivo de tejidos.

En sentido general, y como una consideración final del estudio realizado, se puede decir que solo se observaron diferencias significativas entre las vitroplantas y las estacas en relación a las variables de carácter reproductivo. Estas diferencias evidencian un efecto negativo del método de propagación sobre la precocidad característica de la variedad EEA 18-40, asociado al rejuvenecimiento que experimentan las plantas de guayaba sometidas a la micropropagación. Ese efecto retrasa la producción de las vitroplantas en aproximadamente 1 año con respecto a las plantas de estaca. No obstante, este estudio no descarta el uso práctico del método de propagación in vitro, por el contrario sugiere su aplicación con vistas al establecimiento de ciclos de revigorización que pueden ser aplicables dentro de los programas nacionales de producción de semilla agámica en esta especie.

5. CONCLUSIONES:

1. Se realizó una comparación desde el punto de vista de la fenología del árbol y la bromatología del fruto, entre plantas de guayaba var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 provenientes de la propagación in vitro y del enraizamiento de esquejes durante el primer año de edad.
2. Las principales diferencias observadas están asociadas a las características reproductivas de la variedad, con una sensible disminución de la precocidad, el número de botones y frutos por planta, así como los rendimientos. Todo ello causado por el rejuvenecimiento experimentado por las vitroplantas en relación con las estacas.
3. Las variables fenológicas de crecimiento no muestran diferencias significativas estadísticamente entre uno y otro grupo de plantas, y los rangos de valores se encuentran dentro de lo normal para la variedad EEA 18-40.
4. Para las variables de carácter bromatológico no se detectaron diferencias estadísticas marcadas que impidan a las frutas producidas por las vitroplantas un nivel de aceptación elevado. Por el contrario se determinó una alta similitud físico-química cualitativa y cuantitativa en los frutos de ambos grupos de plantas.
5. Las condiciones climáticas de intensa sequía ocurridas durante el desarrollo del experimento afectaron sensiblemente y produjeron cambios en indicadores químicos como la acidez titulable en ambos grupos de plantas.

6. RECOMENDACIONES:

1. Continuar el estudio comparativo por un período mayor de tiempo con el objetivo de determinar el momento en el cual las cualidades productivas de ambos grupos de plantas se igualan.
2. Se sugiere la aplicación del método de propagación in vitro para proporcionar ciclos de revigorización aplicables a los programas nacionales de producción de semilla agámica en esta especie.

7. BIBLIOGRAFÍA:

1. Adel, A. 2002. Recomendaciones para Mantener la Calidad Postcosecha. Department of Pomology. University of California, Davis, CA 95616. INTERNET: <http://rics.ucdavis.edu/postharvest2/Produce/ProduceFacts/Espanol/Guayaba.shtml>.
2. Aguilera, R. 2001. *Psidium guajava* L. (en línea). Consultado en noviembre del 2003. Disponible en: <http://www.conafor.gob.mx/programasnacionalesforestales/pronare/Fichas%20Técnicas/Psidium%20guajava.pdf>.
3. Ahlowalia, B. 1993. Spectrum of variation in somaclones of triploid ryegrass. *Crop Science* 23:1141-1147.
4. Amin, M. N.; Jaiswal, V. S. 1988. Micropropagation as an aid to rapid cloning of a guava cultivar. *Scientia Hort.* 36: 89-95.
5. Amin, M. N.; Jaiswal, V. S. 1987. Rapid clonal propagation of guava through in vitro shoot proliferation on nodal explants of mature trees. *Plant Cell Organ Cult.* 9:235-244.
6. Araujo, F. J.; Urdaneta, T.; Salazar N.; Simancas, R. 1999. Efecto de la densidad de siembra sobre el rendimiento en guayabo (*Psidium guajava* L.) en la Planicie de Maracaibo, Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 16 Supl. 1. pp 13-16
7. Avilán, L.; Leal, E. y Bautista, D. 1989. Manual de Fruticultura. Cultivo y producción. Editorial América C.A., Caracas, Venezuela. pp. 1475.
8. Azcon-Bieto, J.; Talon, M. 1993. Fisiología y Bioquímica Vegetal. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona; Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, España. pp. 463- 478.
9. Barceló, C. J.; Nicolás R. G.; Sabater, G. B. y Sánchez, T. R. 1992. Fisiología Vegetal. Ediciones Pirámide S.A. Madrid, España. pp. 662.
10. Cañizares, Z. J. 1968. La guayaba y otras frutas Myrtáceas. La Habana. Ed. Revolucionaria. pp. 87
11. Caraballo, B. M. 2001. Biología floral del guayabo (*Psidium guajava* L.) en la Planicie de Maracaibo Plateau, Zulia, Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 18. pp 41-55.
12. Collado, R.; Agramonte, D.; Pérez, J.; Pérez, M.; Gutiérrez, O.; Jiménez, F.; Ramírez, D. 2002. Selección de líneas clonales de guayaba del cultivar var. Enana Roja Cubana (EEA 18-40) para su uso en mejoramiento genético y propagación. *Biología Vegetal*. Vol.2, No.4:207-210.
13. Compton, M.E.; Preece, J.E. 1989. Effects of phenolic compounds on tobacco callus and blackberry shoot cultures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113-160.
14. Dal Vesco, L. 1998. Indicação e controle da embriogênese somática *in vitro* na Goiabaria Serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.). Dissertação apresentada em curso de pós-graduação em Biotecnologia, como requisito para a obtenção do título de Master em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

15. Damasco, O.; Graham, G.; Henry, R.; Adkins, S.; Smith, M.; Godwin, B. 1996. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish (*Musa* spp. AAA) bananas. *Plant Cell Reports*, 16: 118-123.
16. Estación Nacional de Frutales. 1995. Resultados Obtenidos en las Investigaciones 1992-1994. La Habana, Cuba. pp. 34-37.
17. FAO. 2001. Grupo Intergubernamental sobre el Banano y las Frutas Tropicales de la FAO. Segunda reunión. San José, Costa Rica, 4-8 de diciembre .Situación actual de mercado (en línea). Consultado en octubre del 2003. Disponible en: <http://www.fao.org/DOCREP/MEETING/004/Y1982s.HTM>.
18. Gaillard, J. 1978. Etudes sur les fruitiers tropicaux. *Fruits*. 33(9): 543-665.
19. García, W.; Trujillo, R; Concepción, O. 2004. Estudio fenológico de líneas obtenidas a partir de la autopolinización y micropropagación de la guayaba var. Enana Roja Cubana EEA 18-40. Tesis de grado. Facultad de Agronomía. Universidad de Ciego de Avila. pp. 1-48.
20. George, E. F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Ltd. 524p.
21. Gonzáles, G.; Sourd, D. 1985. Comportamiento Mensual de la producción en tres cultivares de guayaba (*Psidium guajava* L.) durante ocho años. *Ciencia, Técnica y Agricultura. Cítricos y Otros Frutales*. 8(1): 15-25.
22. González, G. y Sourd, D 1985. Efecto de la poda manual en cinco cultivares de guayaba. *Agrotecnia de Cuba*. 17(1): 1-8.
23. González, G.; Sourd, D.; Lima, H. 1985. Estudios físico - químicos en frutos de 10 cultivares de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Cítricos y otros Frutales*. 8(4): pp. 47 - 56.
24. Guerrero, J.; Trujillo, R; Concepción, O. 2004. Caracterización fenológica de germoplasma de guayaba obtenido a partir de la polinización libre de la variedad Enana Roja Cubana EEA 18-40. Tesis de grado. Facultad de Agronomía. Universidad de Ciego de Avila. pp. 1-46.
25. Gutiérrez, I. Y.; Gaitén, M. M.; Martínez, O. B.; Naranjo, José y Rodríguez, L. 2000. Suspensión oral antidiarreico de *Psidium guajava*, L. *Revista. Cubana Farm*. 34(1): 9-44.
26. Hamid, L.; Zainon, M. 1998. Guava. En: Philip, E. S.; Harvery, T. C.; Steven, J. N. (Eds). *Tropical and Subtropical Fruit*. Agscience, Inc. pp. 446-485.
27. Hartmann, H. T.; Kester D.E.; Davies, F.T. 1992. *Plant Propagation. Principles and Practices*. Fifth. Edition.
28. Krikorian, A.D. 1991. Estabilidad genotípica en células, tejidos y plantas derivadas de cultivos in vitro. En: Roca, W. M; Mrogrinski, L. A. (eds). *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. CIAT. pp. 313-338.
29. Kunze R., Starlinger; Schwartzd. 1998. DNA methylation of the maize transposable element Ac interferences with its transcription. *Mol. Gen. Genet*. 214, 325-327.
30. Laguado, N.; Pérez, E.; Alvarado, C.; Marín, M. 1999. Características físicoquímicas y fisiológicas de frutos de guayaba de los tipos Criolla Roja y San Miguel procedentes de dos plantaciones comerciales. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 16: 382-397.

31. Larkin, P.J. y Scowcroft, W.R. 1981 Eyespot disease of sugarcane. *Plant Physiol.* 67: 408-414.
32. Laura, V.; Arango, W. 2001. Recursos Genéticos de Guayaba Fitomejoramiento. Disponible en: <http://www.corpoica.org.co/sitiocorpoica/planes/novedad/recguayaba.htm>. Visitado: 25 de Enero de 2006.
33. List, S. E.; Brown, P. H.; Low, C. S.; Walsh, k. B. 1996. A propagation protocol for *Melaleuca alterifolia* (rea tree). *Aust. J. of Exp. Agric.* 36: 755-760.
34. Llorente, R. 2004. Revista (en línea) Discovery Salud. La Importancia de la Vitamina C. Disponible en: http://www.dsalud.com/medicinaorto_numero25.htm. Visitado en: Abril/ 2006.
35. Loh, C.S; Rao, A.N. 1989. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from seedlings and grafted plants and adventitious shoot formation in vitro. *Scientia Hort.* 39:31-39.
36. Mantovani, N.C.1997. Estudio de regeneracao in vitro de caixeta (*Didymopanax morototonii*). Disertacao de Mestrado.
37. Marín, M.; Casassa, A.; Rincón, A.; Labarca, J.; Hernández, Y.; Gómez, E.; Vilorio, Z. 2000. Comportamiento de tipos de guayabo (*Psidium guajava* L.), injertados sobre *Psidium friedrichsthalianum* Berg-Niedenzu1. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 17: 384-392.
38. Marrero, P.; Martínez, M.; Peña. H. A. 1997. Fase fenológicas de la botonización en *Psidium guajava* L. Documento interno. Departamento de Ciencias Biológicas. UNICA.
39. Marrero, P.; Martínez, M.; Peña. H. A.1997. Fases fenológicas del fruto en *Psidium guajava* L. Documento interno. Departamento de Ciencias Biológicas. UNICA.
40. Martínez, M. 1998. Comportamiento fenológico del cultivo de la guayaba (*Psidium guajava* L.) en la región agroclimática de Ciego de Ávila. Trabajo de Diploma. Departamento de Producción Agropecuaria. Facultad de Agronomía. Universidad de Ciego de Ávila.
41. Mederos, O. E.1988. Fruticultura. Ciudad de la Habana. Ed. Pueblo y Educación. pp. 50.
42. Meins,F.1993. Hereditable variation in plant cell culture. *Ann. Rev.Plant. Physiol.* 34: 327-346.
43. Menzel, C. M. 1985. Guava an exotic fruit with potential in Queensland. *Queens. Agric. J.*, III: 93-98.
44. MINAGRI. 1985. Instructivo técnico de la guayaba Enana Roja Cubana. Dirección de cítricos y otros frutales. Ministerio de la Agricultura. Ciudad de La Habana, Cuba. pp. 50.
45. MINAGRI. 2004a. Instructivo técnico de la guayaba Enana Roja Cubana. Dirección de cítricos y otros frutales. Ministerio de la Agricultura. Ciudad de La Habana, Cuba. pp. 12.
46. MINAGRI. 2004b. Informe Estadístico Anual, Modelo 521. Ministerio de la Agricultura. Ciudad de La Habana. Cuba. pp 20.

47. Mohamed – Yasen, Y.; Barringer, S.A; Schnell, R.J.; Splittstoesser, W.E.1995. in vitro shoot proliferation of guava (*Psidium guajava* L.) from germinated seedlings. Plant Cell Report. 14: 525-528.
48. Morales, V.; Rodríguez, M. 2000. Descripción del sistema productivo de la guayaba en Venezuela. Disponible en: <http://www.pronatta.gov.co/retroalim/redes/Guayaba%20actividad.htm> - 34k. Visitado: 15 de Enero de 2006.
49. Morton, J. F. 1987. Fruit of warm climates. Julia F. Morton Publisher. Miami. FL.
50. Nápoles, D.; Trujillo, R; Concepción, O. 2004. Caracterización bromatológica de frutos de líneas obtenidas mediante la polinización libre y la micropropagación de la guayaba (*Psidium guajava* L.) EEA 18-40. Tesis de grado. Facultad de Agronomía. Universidad de Ciego de Avila. pp. 1-54.
51. Normas Cubanas 77-22-1. 1982. Determinación del índice de pH.
52. Normas Cubanas 77-22-16. 1982. Determinación del contenido de ácido ascórbico.
53. Normas Cubanas 77-22-4. 1982. Determinación del contenido de sólidos solubles.
54. Normas Cubanas 77-22-7. 1982. Determinación de la Acidez valorable.
55. Pages, R. 2004. Fruits take their rightful place. Granma Internacional, Diciembre 30, 2004. (Edición digital en inglés). Disponible en: <http://www.granma.cu/ingles/2004/diciembre/juev30/51frutales.html>. Visitado: Mayo 20, 2006.
56. Papadatou, P.; Pontikis, C.A; Eptimiadou, E.; Lydaki, M.1990. Rapid multiplication of guava seedlings by in vitro shoot tip culture. Scientia Horticulturae 45:99-103.
57. Peña, H. A.; Díaz, J. A.; Martínez T. R. 1996. Fruticultura Tropical. ICFES. 2da parte. pp. 83-127.
58. Pérez, A.T. 2000. Propagación in vitro de la guayaba (*Psidium guajava* L.) var. Enana Roja Cubana EEA-18-40. Tesis presentada en opción al grado de Licenciado en Ciencias Biológicas. Universidad de Oriente. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Santiago de Cuba. p.51.
59. Pérez, A.T.; Nápoles, L.; Concepción, O.; Trujillo, R. 2002. Multiplicación *in vitro* de la guayaba (*Psidium guajava* L.) var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 obtenidas a partir de semillas. Revista Cultivos Tropicales 23(3): 57-70.
60. Pérez-Ponce, J.N. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología.1998. Variación Somaclonal. 105-121.
61. PHILLIPS R.L., KAEPLER S.M., & PESCHKE V.M. 1990 Do we understand somaclonal variation? Pp.131-141 in Nijkamp *et al.* (eds.) 1990 (q.v.9.
62. Pontikis, C.A. 1996. *Psidium guajava* L. En: Bajaj, Y.P.S. (ed). Biotechnology in agriculture and Forestry, v.35, Trees IV p. 308-320.
63. Pumar, Y.; Cabrera, E. 2003. Frutas Tropicales más años de vida con mejor salud (en línea). Consultado en septiembre del 2003. Disponible en: <http://www.solysonmagazine.com/tem.php?section=40&item=27&issue=81&lang=1>.

64. Ramírez, M.; Urdaneta, A.; Marín, M. 1999. Injertación y estaquillado en el guayabo bajo condiciones de bosque muy seco tropical. *Agronomía*. (LUZ) 16 (1): 36-42.
65. Rodríguez, H.; Hernández, J.; Carrera, N. 1990. Efecto del nitrógeno, fósforo y potasio sobre el rendimiento y calidad del fruto de guayabo (*P. guajava*) cultivar EEA-18-40. *Revista Ciencia y Técnica de la Agricultura. Cítricos y otros frutales* 13(1): 111-118.
66. Rodríguez, R.; Fernández, M.; Pacheco, J.; Cañal, M.J. 2005a. Envejecimiento vegetal, una barrera a la propagación, alternativas. En: Sánchez-Olate, M. y Ríos, D.G. (Eds.) *Biología vegetal en especies leñosas de interés forestal*. Imprenta Austral, Concepción, Chile. pp. 29-48.
67. Sabir, A.; Newbury, H.J.; Todd, G.; Catty, J.; Ford-Lloyd, B.V. 1992. Determination of genetic stability using isozymes and RFLPs in beet plants regenerated *in vitro*. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 84(1-2): 113-117.
68. Salisbury, F.B; Ross, C.W. 1992. *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamérica S.A. pp 339-451.
69. Saltos X.; Robalino D.; Ulloa A.; Urrutia Á.; Vásconez C. Evaluación de los Cambios en las Vías Metabólicas en Guayaba (*Psidium guajava* L.) Subproyecto 6: Propiedades Químicas - Físicas y Organolépticas. 2003. Disponible en: <http://www.uta.edu.ec/cenic/pbid178/subproyecto6.htm>. Visitado en: 20 de Febrero de 2006.
70. Sandoval, J.A.; Pérez, L.; Cote, F. 1997. Estudio morfológico y de la estabilidad genética de plantas variantes de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano). *CORBANA*, 22(48): 41-60.
71. Sandoval, J.A.; Tapia, A.; Muller, L.; Villalobos, A. 1991. Observaciones sobre la variabilidad encontrada en plantas micropropagadas de *Musa* cv. Falso Cuerno (AAB). *Fruits*, 46(5): 533-539.
72. Siddiqui, Z.M y Farooq, S.A. 1996. Role of anti-oxidants in the elimination of phenolic compounds from *in vitro* culture of *Psidium guajava* L. (guava). *Plant Sci.*, 9(2): 155-158.
73. Singh, R. B.; Rastogi, S. S.; Singh, R.; Ghosh, S.; Niaz, M. A. 1992. Effects of guava intake on serum total and high-density lipoprotein cholesterol levels and systemic blood pressure. *Am. J. Cardiology* 70(1): 287-1291.
74. Sosa, Y.E.; Trujillo, R; Concepción, O. 2004. Estudio bromatológico de líneas de guayaba obtenidas a partir de la autopolinización y micropropagación de la variedad Enana Roja Cubana EEA 18-40. Tesis de grado. Facultad de Agronomía. Universidad de Ciego de Avila. pp. 1-49.
75. Sotolongo, R. S. 1998. Tecnología para la propagación masiva *in vitro* de *Psidium salutare* (HBK) Berg. En: *Resúmenes del III Encuentro Latinoamericano de Biología Vegetal REDBIO'98*. Ciudad de la Habana. Cuba.
76. Terán, L.; Meléndez, I.; García, A. L.; Acuña, G. J.; Urdaneta, M. 1996. Efecto de la aplicación de nitrógeno y potasio en el rendimiento del cultivo de la guayaba (*Psidium guajava* L.). *Revista de Agronomía (LUZ)* 13: 363-370.

77. Tong, F.; Medina d.; Esparza D. 1991. Variabilidad en poblaciones de guayaba *Psidium guajava* L. del municipio Mara del estado Zulia. Revista de Agronomía (LUZ) 8(1): 15-27.
78. Vázquez, E.; Torres, G. S. 1995. Fisiología Vegetal. Editorial Pueblo y Educación. pp. 279-280.
79. Ventocilla. J; De Rubalcava, M. 2003. La prensa. Instituto Smithsonian. Disponible en: <http://mensual.prensa.com/mensual/contenido/2003/12/14/hoy/revista/1409202.html>. Visitado en: 15 de Febrero de 2006.
80. Vilchez, J.; Albano, N.; Gadea, J.; Vitoria, Z. y Castro, C. Propagación asexual de *Psidium guajava* L. mediante la técnica del acodo aéreo. En: Congreso Nacional de Fruticultura. (6: 1997: Barquisimeto), 1997.
81. Villalobos, V. M.; Thorpe, T. A. 1991. Micropropagación, conceptos, metodologías y resultados En: Roca, W. M; Mrogrinski, L. A. (eds). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones prácticas. CIAT. pp. 127-142.
82. Yadava, U. L. 1994. Physicochemical properties of guava produced in Georgia. Science. 29: 536-537.
83. Yadava, U. L. 1996. Guava production in Georgia under cold protection structure. En: Progress in new crops. Arlington: ASHS Press. Pp. 451-457.