

Universidad de Costa Rica
Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

Escuela de Biología

Licenciatura en Genética y Biotecnología

Trabajo final de graduación: Práctica dirigida

**Establecimiento y cultivo *in vitro* de
Pouteria sapota (Jacquin) H. E. Moore
& Stearn**

Ivannia Chinchilla Salazar

2008

*A mis padres,
hermanos
amigos
y a Cristian
por su apoyo y consejo incondicional.*

A todos ellos con mucho esfuerzo, dedicación y cariño les dedico este trabajo.

“Esta Memoria de una Práctica Dirigida fue aceptada por la comisión de Trabajos Finales de Graduación de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Licenciada en Biología, con énfasis en Genética y Biotecnología”.

Tutor: Dr. Jorge Mora Urpí

Profesor emérito de la Escuela de Biología, UCR

Lector: M.Sc. Jorge Herrera Quirós

Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), UCR

Lector: M.Sc. Álvaro Azofeifa Delgado

Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), UCR

Lector: Dr. Víctor Jiménez García

Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), UCR

Dr. Virginia Solís

Directora de la Escuela de Biología, UCR

Sustentante: Lic. Ivannia Chinchilla Salazar

Escuela de Biología, UCR

Agradecimiento

*A mi Comité Asesor
y al Ing. Edgar Vargas[†]
por el valioso conocimiento adquirido, consejo y dirección
para realizar esta Práctica Dirigida de la mejor forma.*

*A los señores Carlos Astorga y Carlos Umaña del CATIE
A la Dra. María Laura Arias de la Facultad de Microbiología
y a la Bach. Isabel Mora del Laboratorio de Biotecnología del CIGRAS
gracias por el apoyo*

Índice general

Dedicatoria.....	i
Comité asesor.....	ii
Agradecimiento.....	iii
Índice general.....	iv
Índice de cuadros.....	vi
Índice de figuras.....	viii
Resumen.....	x
Abreviaciones.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivo.....	3
1.1.1. General.....	3
1.1.2. Específicos.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1. Botánica.....	5
2.1.1. Taxonomía.....	5
2.1.2. Morfología.....	6
2.1.3. Origen y distribución.....	8
2.1.4. Usos.....	9
2.2. Cultivo en Costa Rica.....	10
2.2.1. Propagación sexual.....	10
2.2.2. Propagación vegetativa.....	11
2.2.2.1. Micropropagación <i>in vitro</i>	11
2.2.2.1.1. Cultivo <i>in vitro</i> en sapotáceas.....	12
2.2.2.1.2.1. <i>Pouteria sapota</i>	13
3. METODOLOGÍA.....	16
3.1 Sitio de recolecta.....	16
3.2. Sitio de trabajo.....	16
3.3. Pruebas de desinfección del material <i>in vitro</i>	16
3.3.1. Explantes utilizados.....	16
3.3.2. Preparación del material en invernadero.....	17
3.3.3. Procedimiento de Desinfección I.....	17
3.3.4. Procedimiento de Desinfección II.....	18
3.3.5. Medio de cultivo utilizado.....	19
3.3.6. Agentes bióticos contaminantes.....	19
3.3.7. Subcultivo y evaluación.....	19
3.4. Tratamiento con reguladores de crecimiento <i>in vitro</i> sobre material proveniente de invernadero.....	20
3.4.1. Material de trabajo y desinfección.....	20
3.4.2. Medios de cultivo.....	20

3.4.2.1. Medio de inducción a regeneración.....	20
3.4.2.1. a. Medio de inducción con citoquinina.....	20
3.4.2.1. b. Medio de inducción combinado: citoquinina con auxina.....	21
3.4.2.2. Medio inductor a callogénesis.....	22
3.4.3. Subcultivo y evaluación.....	22
4 RESULTADOS.....	23
4.1 Desinfección I y II e identificación de contaminantes.....	23
4.1.1 Material de campo.....	23
4.1.2. Material de invernadero.....	28
4.2. Tratamientos con diferentes reguladores de crecimiento sobre material proveniente de invernadero.....	30
4.2.1. Hoja.....	30
4.2.2. Eje apical.....	30
4.2.2.1. Tratamiento con BAP y tratamiento con BAP + PVP.....	31
4.2.2.2. Tratamiento con kinetina + PVP.....	38
4.2.3.3. Tratamiento de BAP + ANA.....	40
4.2.3. Meristemo lateral.....	40
4.2.3.1. Tratamiento con BAP y tratamiento con BAP + PVP.....	40
4.2.3.2. Tratamiento con kinetina y PVP.....	43
4.2.3.3. Tratamiento de BAP + ANA.....	44
5. DISCUSIÓN.....	46
5.1. Pruebas de desinfección e identificación de contaminantes.....	46
5.1.1. Material de campo.....	46
5.1.2. Material de invernadero.....	48
5.2. Reacción del material de invernadero a diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento <i>in vitro</i>	50
5.2.1. El medio de cultivo.....	51
5.2.2. A nivel de hoja.....	51
5.2.3. A nivel de eje apical.....	52
5.2.4. A nivel de meristemo lateral.....	52
5.2.5. Efecto del PVP.....	53
5.2.6. Consideraciones para investigaciones futuras.....	54
6. CONCLUSIONES.....	56
7. REFERENCIAS.....	57

Índice de cuadros

Cuadro		Página
Cuadro 1.	Concentraciones de citoquininas y de PVP en medio WPM utilizado para cultivar hojas, ejes apicales y meristemas laterales de <i>P. sapota</i>	21
Cuadro 2.	Efecto de la Desinfección I en explantes de hoja de <i>P. sapota</i> provenientes de invernadero sobre la contaminación y la necrosis después de 16 y 42 días de cultivo <i>in vitro</i>	28
Cuadro 3.	Efecto de la Desinfección I en ejes apicales de <i>P. sapota</i> provenientes de invernadero sobre la contaminación y la necrosis después de 16 y 42 días de cultivo <i>in vitro</i>	29
Cuadro 4.	Efecto de la concentración de 1% de NaOCl sobre la desinfección de segmentos de hoja y ejes apicales de <i>P. sapota</i> provenientes de invernadero sobre la contaminación y la necrosis (n = 200).....	30
Cuadro 5.	Efecto del tratamiento con BAP y del tratamiento de BAP + PVP en ejes apicales de <i>P. sapota</i> a los 56 días de cultivo (n = 12 en cada unidad experimental).....	33
Cuadro 6.	Efecto promedio del tratamiento con BAP sobre la longitud y el número de hojas por explante en ejes apicales de <i>P. sapota</i>	36
Cuadro 7.	Efecto promedio del tratamiento de BAP + PVP sobre la longitud y número de hojas de cultivo de ejes apicales de <i>P. sapota</i>	37
Cuadro 8.	Efecto del tratamiento con kinetina con PVP en ejes apicales después de 48 días de cultivo (n = 12 explantes en cada unidad experimental)...	38
Cuadro 9.	Efecto promedio del tratamiento con kinetina + PVP sobre la longitud y el número de hojas por explantes en ejes apicales de <i>P. sapota</i>	39
Cuadro 10.	Efecto de los tratamientos de BAP + ANA en ejes apicales después	

de <i>P. sapota</i> después de 32 días cultivo (n = 12 explantes en cada unidad experimental).....	40
Cuadro 11. Efecto del uso de BAP y de BAP +PVP en meristemo laterales de <i>P. sapota</i> , después de 40 días de cultivo (n = 12 explantes en cada unidad experimental).....	41
Cuadro 12. Efecto del tratamiento de kinetina con PVP para explantes de meristemo lateral a los 32 días de cultivo (n = 12 explantes en cada unidad experimental).....	44
Cuadro 13. Efecto del uso de BAP + ANA para meristemo lateral a los 32 días (n= 12 explantes en cada unidad experimental).....	45

Índice de figuras

Figura	Página
Figura 1. <i>Pouteria sapota</i> . Hojas, flores, fruto y semilla.....	7
Figura 2. Distribución de <i>Pouteria sapota</i> Jacquin en Costa Rica.....	8
Figura 3. Porcentaje de contaminación de explantes de hoja provenientes de campo de acuerdo a la concentración NaOCl en la Desinfección I a los 16 días de cultivo.....	23
Figura 4. Porcentaje de contaminación de explantes de hoja provenientes de campo de acuerdo a la concentración de NaOCl en la Desinfección II a los 16 días de cultivo.....	24
Figura 5. Porcentaje de contaminación de explantes de ejes apicales provenientes de campo de acuerdo a la concentración de NaOCl en la Desinfección I a los 16 días de cultivo.....	25
Figura 6. Porcentaje de contaminación de explantes de ejes apicales provenientes de campo de acuerdo a la concentración de NaOCl en la Desinfección II a los 16 días de cultivo.....	25
Figura 7. Análisis de regresión en la Desinfección II para determinar la relación del sistema de desinfección con la dosis de NaOCl en el ataque de hongos en los explantes de hoja a los 16 días de cultivo.....	26
Figura 8. Análisis de regresión en la Desinfección II para determinar la relación del sistema de desinfección con la dosis de NaOCl en el ataque de hongos en los explantes de ejes apicales (proveniente de material de campo) a los 16 días de cultivo.....	27
Figura 9 Efecto del período de cultivo <i>in vitro</i> en medio WPM con BAP y 2,4-D de secciones de hoja de <i>P. sapota</i> . A) Condición inicial en la introducción. B) A los 15 días de cultivo y C) a los 40 días de cultivo.....	31

Figura 10. Análisis de regresión del grado de necrosis en el tratamiento de BAP y en el tratamiento de BAP con PVP.....	32
Figura 11. Ejes apicales. Comportamiento general tanto en el tratamiento con BAP en la concentración de 1,5 mg/l como en el tratamiento de BAP con PVP en las concentraciones 1-2 mg/l D).....	35
Figura 12. Meristemo lateral. Primordios.....	42

Resumen

Se plantearon dos metodologías para la desinfección de ejes apicales y hojas provenientes de campo e invernadero en *Pouteria sapota* (Sapotaceae), estas metodologías se describen a continuación. La Desinfección I consistió en el lavado a chorro de los explantes por 10 minutos, se enjuagaron con una solución de detergente, se cepilló suavemente la superficie y se eliminó los residuos de detergente con agua a chorro. Posteriormente se sumergieron en una disolución de benomil (2 g/l) y agrimicin (2 g/l) por un periodo de 30 minutos, seguido de dos lavados con agua destilada estéril. Luego se desinfectaron en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0; 1; 1,5; 2 y 2,5% con cuatro gotas de Tween 20 por cada 100 ml de solución por 20 minutos y se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Los lavados se efectuaron en cámara de flujo laminar, en donde las hojas se seccionaron en segmentos de 1 x 1 cm aproximadamente y los ejes apicales de 1 a 2 cm de largo. Estos explantes se sembraron en un medio con sales y vitaminas de Murashige y Shoog (MS), con 30 g/l de sacarosa, pH 5.8 y 8 g/l de agar. En la Desinfección II se realizó los mismos pasos pero se sustituyó la combinación de benomil y agrimicin por una disolución de Tri-Miltox (2 g/l) y Kilol (5 ml/l) con 4 gotas de Tween 20 por cada 100 mL. Los explantes se mantuvieron en esta disolución durante 4 horas en agitación. Trascurrido el tiempo se sumergieron por 20 minutos en una disolución de NaOCl 1%, más 4 gotas de Tween 20 por cada 100 mL. Al igual que en la Desinfección I los explantes fueron seccionados y se sembraron en un medio con sales y vitaminas de MS, con 30 g/l de sacarosa, pH 5.8 y 8 g/l de agar.

Con respecto al material proveniente de campo, la Desinfección I y II en hoja mostró la aparición de gran diversidad de contaminantes; por su lado, en ejes apicales se observó menor diversidad de contaminantes. Sin embargo, en ambos casos la contaminación fue alta e impráctica para la introducción de material *in vitro* de manera eficiente. A pesar del alto porcentaje de contaminación observado, se considera que el mejor resultado se obtuvo con la Desinfección I, utilizando 1% de NaOCl (alrededor de 40% en hoja y 50% en ápice). El

material proveniente de invernadero presentó menor incidencia de contaminantes, así como menor diversidad de los mismos tanto en hoja como en ejes apicales, con respecto al material de campo. Se obtuvo el mejor resultado en el material proveniente de invernadero usando la Desinfección I con 1% de NaOCl (5% en hoja y 25% en ápice).

Adicionalmente se evaluó el efecto de varios reguladores de crecimiento en explantes de ejes apicales, meristemo lateral y hoja provenientes de plantas de invernadero. En hoja se estudió el efecto de 6-bencilaminopurina (BAP) y del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en un medio Woody Plant Medium (WPM) pero no hubo respuesta en ninguna de las concentraciones empleadas. En ejes apicales y meristemos laterales se evaluaron diferentes concentraciones de BAP, BAP + polivinilpirrolidona (PVP) (7g/l), kinetina + PVP (7g/l) y BAP + ácido naftalenacético (ANA) + PVP (7g/l), todos los anteriores en un medio WPM, además de BAP + ANA en un medio con las sales y minerales de MS. En todos los tratamientos se utilizó un “testigo” el cual no poseía regulador de crecimiento. Se expuso los 3 primeros días de cultivo a 1 mg/l de GA₃.

Se observó crecimiento de las hojas preformadas en los explantes de ejes apicales, así como la formación de nuevas hojas e hinchamiento de la zona apical de los ejes apicales. En el meristemo lateral se dio la formación de callo de color blanco con proyecciones paralelas, las cuales se desmoronaron al subcultivar. Se registraron en la concentración de 1 mg/l de BAP, en el testigo del tratamiento de kinetina + PVP y en el tratamiento con 1 mg/l de BAP + 0.5 mg/l de ANA en un WPM.

Palabras claves: *Pouteria sapota*, Sapotaceae, regulador de crecimiento, desinfección, contaminante endógeno, introducción *in vitro*, recursos fitogenéticos.

Abreviaciones

ANA:	Ácido naftalenacético.
BAP:	6-bencilaminopurina.
CATIE:	Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.
CIGRAS:	Centro para Investigaciones en Granos y Semilla.
GA ₃ :	Ácido giberélico.
kinetina:	6-furfurilaminopurina.
MS:	Murashige & Skoog (1962).
NaOCl:	Hipoclorito de sodio.
PVP:	Polivinilpirrolidona.
UCR:	Universidad de Costa Rica.
WPM:	Woody Plant Medium.
2,4-D:	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.
TDZ:	Tidiazurón
AC:	Carbón activado
PVPP:	Polivinilpolipirrolidona
HgCl ₂ :	Cloruro de mercurio
AIB:	Ácido indol-3-butírico

1. INTRODUCCIÓN

Pouteria sapota es miembro del orden Ericales, familia Sapotaceae. A lo largo de Mesoamérica es conocido con diversos nombres como zapote, sapote y mamey entre otros (Pennington 1990).

El zapote, es una de las frutas más importantes de las tierras bajas de Centroamérica. Es considerado por algunos como una de las mejores frutas del Hemisferio Occidental, sin embargo, es muy poco conocido. Se consume principalmente como fruta fresca, aunque es cada vez mayor su empleo en forma procesada en la industria doméstica de dulces o cajetas y como ingrediente para productos congelados (helados, pulpas, y otros). La semilla posee propiedades medicinales (Quesada 1996 y Lobato 1998).

En Costa Rica el cultivo de este árbol se ha realizado de forma aislada mediante propagación sexual, por lo que los árboles no son homogéneos en sus características de interés agronómico (Quesada 1996). Entre las características variables en los árboles están: rendimiento, calidad del fruto (tamaño, forma, color, sabor y textura), adaptabilidad, épocas de producción y sanidad (Vázquez y Alfonseca 2006). Estos estudios de variabilidad se han desarrollado en la colección de *P.sapota* del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), la cual es la más importante en el país.

El cultivo *in vitro* exitoso con material proveniente de la colección de *P. sapota* del CATIE no ha sido posible (Lobato 1998). Se han presentado problemas por la contaminación con bacterias y hongos, además de necrosis del material utilizado. Dentro de los obstáculos mencionados la contaminación por bacteria ha sido la de mayor incidencia.

Roca (1996) introdujo material *in vitro* de *P. sapota* y obtuvo regeneración de brotes a partir de meristemos. Sin embargo, no aclara si fue posible la aclimatización de plantas a condiciones de invernadero. Azurdia (2006) manifiesta que la regeneración *in vitro* de *P. sapota* no es fácil y que los trabajos que se han realizado no han tenido éxito, este autor menciona dentro de estos el trabajo de Roca (1996).

Debido a la gran variabilidad de las poblaciones, a la dificultad durante el proceso de introducción de material aséptico y al poco éxito en la obtención de un método donde se logre la micropropagación de *P. sapota*, es de interés establecer condiciones de propagación vegetativa *in vitro* para lograr su propagación clonal. Además, una vez establecidas las condiciones para la introducción *in vitro* se podría propagar genotipos seleccionados por sus características deseables e incluso desarrollar nuevas variedades por procedimientos tales como la fusión de protoplastos.

1.1 Objetivo

1.1.1. General

- Evaluar las condiciones adecuadas para el establecimiento y cultivo *in vitro* de *Pouteria sapota*, para que estas sirvan de base para la búsqueda de metodologías de propagación, conservación y posible mejoramiento genético de esta especie de valor agronómico.

1.1.1.1 Específicos

- Establecer una metodología para la introducción *in vitro* del material (hojas y ejes apicales) de *Pouteria sapota*.
- Evaluar la respuesta de diferentes tipos de explantes (hojas y ejes apicales) provenientes de campo e invernadero durante su establecimiento *in vitro*.
- Determinar, a nivel de género, los tipos de hongos y bacterias que se presentan durante la introducción del material (hojas y ejes apicales) al cultivo *in vitro*.
- Evaluar la influencia de 6-bencilaminopurina (BAP) y 6-furfurilaminopurina (kinetina) sobre diferentes explantes (hojas, ejes apicales y meristemos laterales) de *Pouteria sapota*, bajo condiciones *in vitro*.

- Evaluar la influencia de la polivinilpirrolidona (PVP) en la respuesta del explante (ejes apicales y meristemas laterales) a tratamientos de BAP, bajo condiciones *in vitro*.
- Evaluar la respuesta del material vegetal (ejes apicales y meristemo lateral) al utilizar BAP y ácido naftalenacético (ANA) de forma combinada.
- Evaluar el efecto del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) sobre material de hoja, bajo condiciones *in vitro*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Botánica

2.1.1 Taxonomía

P. sapota pertenece a la familia Sapotaceae, la cual es miembro del Orden Ericales, compuesta de árboles y arbustos con 53 géneros y con más de 1250 especies. Se distribuyen en regiones tropicales y subtropicales (Igor *et al.* 2005; Swenson y Anderberg 2005).

P. sapota recibe diversos nombres comunes como: Grand sapotillier (Haití), mamey (general), manzano mamey (Belice), mamey colorado (general), mamey de tierra (Panamá), mamey mata serrana (Ecuador), mamme sapota (Jamaica), sapote (general), sapote colorado (Honduras), sapote de montaña (Guatemala), zapote, zapote mamey (general). Así también, a lo largo del tiempo *P. sapota* ha recibido diversos nombres científicos (Pennington 1990), a saber: *Achras zapota* Linnaeus (1753), *Achras zapota major* Jacquin (1753), *Sideroxylum sapota* Jacquin (1760) *Achras mammosa* Linnaeus (1762), *Sapota mammosa* Miller (1768), *Lucuma mammosa (mammosum)* Linnaeus (1807), *Lucuma bonplandii* Kunth (1819), *Calospermum mammosum* Linnaeus (1860), *Vitellaria mammosa* Linnaeus (1882), *Calospermum mammosum* var. *bonplandii* (Kunth) (1890), *Calospermum mammosum* var. *candollei* Pierre (1890), *Calospermum mammosum* var. *ovoidea* Pierre (1890), *Calocarpum mammosum* Linnaeus (1904), *Calocarpum mammosum* var. *bonplandii* (Kunth) (1904), *Calocarpum mammosum* var. *candollei* Pierre (1904), *Calocarpum mammosum* var. *ovoideum* Pierre (1904), *Achradelpha mammosa* Linnaeus (1913), *Calocarpum sapota* Jacquin (1923), *Calocarpum huastecanum* Gilly (1944) y *Pouteria mammosa* Linnaeus (1946). El nombre actual fue designado en 1967 por Jacquin.

Los trabajos taxonómicos posteriores toman como base la clasificación de Pennington (1990), pero actualmente se debate una clasificación más acorde con las características morfológicas y moleculares de esta familia (Igor *et al.* 2005; Swenson y Anderberg 2005).

La sistemática de las sapotáceas es complicada debido a la gran homoplasia de sus caracteres morfológicos (casos de paralelismo evolutivo) (Igor *et al.* 2005), como es el caso de la gran diversidad en hojas alternas y simples, de borde entero con excepciones (*Leptostylis*, *Pichonia* y *Sarcosperma*), flores simples o compuestas, los estambres son siempre opuestos a los lóbulos de la corona, algunos de éstos lóbulos son estaminados. Otra característica son los pelos malpígios en diferentes órganos, como en pedúnculos-tallos y una estructura de un tallo pequeño y dos ramas a menudo de diferente longitud (Swenson y Anderberg 2005).

2.1.2 Morfología

Pouteria sapota, es una especie polimórfica y caducifolia. Por lo común, los árboles adultos alcanzan 30 m y tienen copa asimétrica (Quesada 1996). Las hojas son largas y delgadas, agrupadas cerca del ápice, de 15-30 cm de largo, glabras y lustrosas en el haz, de color blanquecino, con nervios laterales casi perpendiculares al centro; con pecíolos de 3 a 5 cm de largo, glabros o pubescentes (Azurdía 2006).

Las inflorescencias se distribuyen en fascículos de 3-6 flores, agrupadas en las axilas de las hojas, con pedúnculos de 2,5 a 3 mm de largo. Las flores son actinomorfas con cáliz verde parduzco y numerosos sépalos; los inferiores poseen pubescencia en la superficie externa; tienen corona color crema verdoso de 7 a 8 mm de largo; son anchas de forma tubular en la parte inferior, con 4 a 5 lóbulos de 4 mm de largo; tienen 4-5 estambres de 4 mm de largo, insertos en la base de la corona y opuestos a los lóbulos de la corona; es notable la presencia de 5 estaminodios alternos a los estambres; también el ovario

pubescente, el estigma pequeño y simple, usualmente por encima de la corona, tanto en estado de yema como de flor (Azurdia 2006).

El fruto en *P. sapota* varía de esférico a elipsoidal; es ancho en la base, angosto al eje apical, con 8-22 cm de largo, con la cáscara delgada, color canela, rugoso y con escamas. La pulpa, rojo fuego, uniforme y compacta, es muy dulce y ligeramente aromática. Las semillas de los zapotes, generalmente una sola en *P. sapota* y a veces 2 en *Pouteria viridis*, se llaman “zapoyolas” en América Central. Miden hasta 8 cm de largo y tienen la superficie dura y brillante, de color pardo-oscuro, excepto en una franja longitudinal, que es opaca, rugosa y más clara (Fig. 1) (León y Poveda 2000).

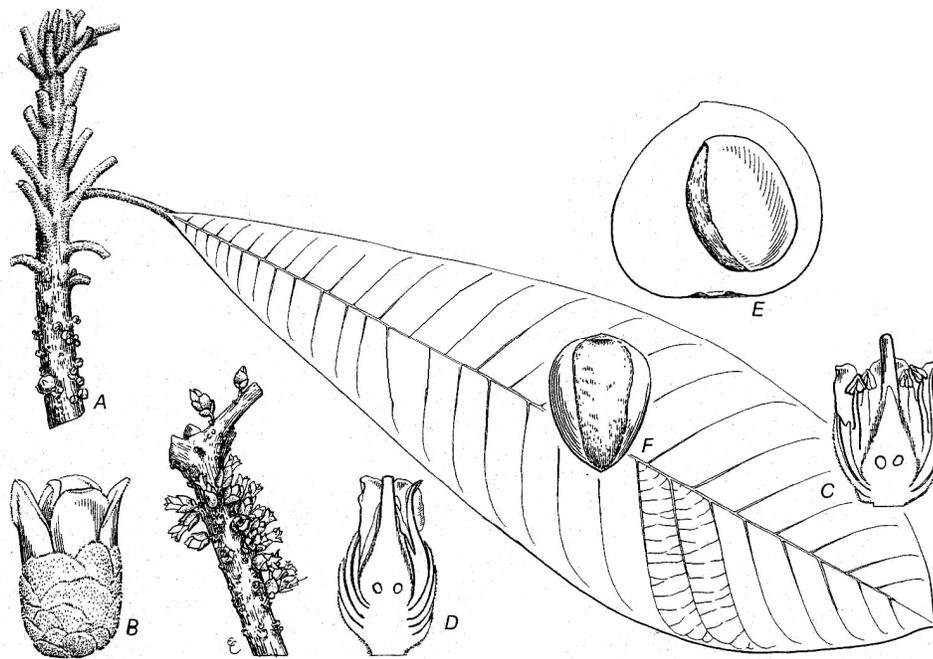


Figura. 1. *Pouteria sapota* A) Hoja. B) Flores. C) Vista longitudinal de la flor masculina. D) Vista longitudinal de la flor femenina. E) Vista longitudinal del fruto. F) Semilla. Tomado de Pennington (1990).

2.1.3. Origen y distribución

Se considera que el centro de origen de las sapotáceas radica en Asia y que de ahí se expandieron a África y luego a América (Igor *et al.* 2005; Swenson y Anderberg 2005). En el caso específico de *P. sapota*, se considera que es originaria de Mesoamérica y es cultivada en todas las regiones tropicales (León y Poveda 2000). *P. sapota* se encuentra desde el sur de México (península de Yucatán), Guatemala, Belice, el norte de Honduras y posiblemente la costa Atlántica de Nicaragua.

Esta especie no parece ser nativa de Costa Rica o Panamá, donde es remplazada por *P. viridis* y *P. fassicola*. En Costa Rica *P. sapota* crece desde el nivel del mar hasta los 1400 metros de altitud (Figura 2) (Quesada (1996). Algunos autores mencionan que aquellos árboles que crecen por encima de los 1000 m.s.n.m no fructifican (Gazel *et al.* 1999).

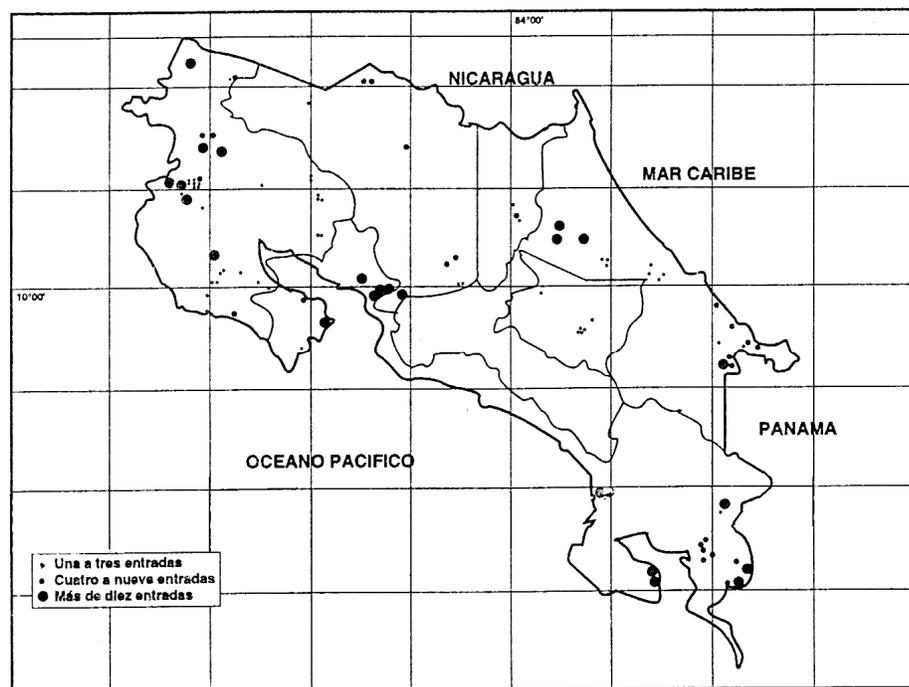


Figura 2. Distribución de *Pouteria sapota* Jacquin en Costa Rica. Tomado de Quesada (1996).

Existen concentraciones significativas de individuos de esta especie en algunas localidades del Pacífico Central (Orotina, San Mateo y Esparza), Pacífico Norte y en las zonas Atlántica y Sur. Las concentraciones más grandes se han encontrado en el noroeste del país, en varias regiones de Guanacaste (Sardinal, Filadelfia, La Cruz y Liberia). Otra región con alta densidad de *P. sapota* incluye Guápiles y Guácimo (Quesada 1996).

2.1.4 Usos

El fruto de *Pouteria* usualmente se come directamente o en preparaciones donde la pulpa fresca o congelada se mezcla con otros ingredientes para realizar licuados o helados. Además la pulpa es utilizada en jaleas, pastas y conservas (Lobato 1998). En México y Centro América las semillas molidas se utilizan para dar al chocolate un sabor amargo y un aroma característico (Lobato 1998).

La semilla se usa también para combatir la sinusitis, bajar la fiebre y en alcohol combate la artritis (Quesada 1996). El aceite extraído de la misma es empleado contra dolores musculares y afecciones reumáticas (Lobato 1998). También se utiliza para la fabricación de cremas y jabones para proteger la cara (Quesada 1996), en El Salvador y Guatemala se utiliza como un tónico para la piel y como revitalizador para evitar la caída del pelo (Lobato 1998). Además, la corteza y las hojas en cocción se usan contra la arteriosclerosis y pueden servir para bajar la presión arterial (CATIE 1997).

Las hojas con frecuencia se usan para envolver las plantas de tomate a la hora del trasplante, evitando daños de gusanos cortadores y otras plagas del suelo (Lobato 1998). En Puerto Rico se ha comprobado que la semilla pulverizada o el látex del fruto verde pueden utilizarse como insecticida (Lobato 1998).

La madera es utilizada para construcción de casas, muebles, puentes, cercas de potreros y leña, ya que es muy resistente a la humedad (CATIE 1997).

2.2. Cultivo en Costa Rica

En Costa Rica no existen grandes plantaciones de *P. sapota* en monocultivo y lo frecuente es que estos árboles se siembren por medio de semillas en asocio con otros cultivos (cacao, aguacate, papaya, yuca, otros); además, se encuentran en potreros y en patios de casas. A estos árboles por lo general no se les realiza ninguna labor, excepto cosecharlos (Quesada 1996).

Las frutas se cosechan antes de que alcancen el punto óptimo de maduración natural, por lo que cuando se recolectan antes del punto de maduración no maduran, o lo hacen parcialmente (Quesada 1996), la colecta en su punto óptimo de maduración también es un problema ya que es climatérico (Henrique 1973 y Martínez *et al.* 2004).

2.2.1. Propagación sexual

La limitación más grande del cultivo de *P. sapota* es la gran variabilidad que se observa en la progenie propagada por semilla. Entre las características variables en los árboles están: calidad del fruto (tamaño, forma, color, sabor y textura), adaptabilidad, susceptibilidad a enfermedades, disposición de las ramas, distribución de la cosecha, floración, fructificación y producción de frutos (Gazel *et al.* 1999 y Vázquez y Alfonseca 2006).

La germinación de semillas en *P. sapota* varía entre 80 y 90% (Umaña 2006¹, comunicación personal), Éstas son recalcitrantes, por lo que se deben colocar de inmediato en camas de germinación. Las plántulas tardan entre 15 y 40 días en emerger (Umaña 2000).

¹ Umaña 2006. Porcentajes de germinación en *P. sapota* en invernadero. CATIE, Turrialba.

2.2.2. Propagación vegetativa

La propagación vegetativa en plantas se utiliza cuando se produce o dispone de poca cantidad de semilla o cuando al propagar por medio de semilla, se presenta una variabilidad genética indeseable (Milton y Allen 2003).

La propagación vegetativa, en general, puede hacerse por medio de raíces, tubérculos, estolones, rizomas, ramitas, estacas de tallo o foliares, injertos, o por medio de cultivo de tejidos. Las plantas obtenidas por éstos medios serán, en gran medida, clones de la planta donante (Milton y Allen 2003). En el CATIE se ha realizado ensayos de injertación en *P. sapota* con porcentajes de prendimiento variable (30,50, 90 y 100%) (Umaña 2000), en México se ha logrado obtener el 80% de prendimiento (Vázquez y Alfonseca 2006).

2.2.2.1. Micropropagación *in vitro*

Según Ashmore (1997) y Rathore *et al.* (2004), el uso del cultivo *in vitro* presenta una serie de ventajas, tales como: se puede eliminar virus por medio del cultivo de meristemas, presenta una rápida y uniforme propagación clonal para mantener genotipos élite, es una herramienta importante para la germinación de semillas cuando estén inmaduras o que en el campo necesiten de una serie de condiciones que usualmente es difícil de mantener, como la temperatura, la humedad y los nutrientes, facilita la exportación o movimiento del material al distribuir, debido a la asepsia; además, se puede concentrar gran cantidad de material en un área pequeña. También se facilita las condiciones de crecimiento estables, se pueden aplicar otras técnicas a partir de una adecuada metodología de regeneración como la criopreservación, inserción de genes y microinjertos, entre otros.

Aunque la micropropagación presenta muchas ventajas, también tiene una serie de desventajas. Por ejemplo, las instalaciones son costosas y se requiere capacitar al personal. Errores al mantener la correcta identificación de los genotipos ocurren con cierta

frecuencia. También se requiere una verificación del cultivar que se maneje. Además, puede ocurrir introducción de organismos patógenos desconocidos y no detectados durante el cultivo o la aparición de variantes. En algunos cultivares y con ciertos sistemas de cultivo, se pueden originar modificaciones genéticas y epigenéticas, que pueden alterar las características de las plantas producidas, fenómeno conocido como variación somaclonal (Lobato 1998 y Singh et al. 2004).

En un programa de micropropagación se debe tener conocimiento de estos problemas potenciales y efectuar una evaluación de estos efectos en la producción de plantas (Lobato 1998).

2.2.2.1.1. Cultivo *in vitro* en sapotáceas

Jordan y Oyanedel (1992) probaron diferentes medios de cultivo con diferentes reguladores de crecimiento, para la regeneración *in vitro* de *Pouteria locuma*. La desinfección empleada consistió en la incubación por 5 horas en una solución con los antibióticos empleados por Young *et al.* (1984, citados por Jordan y Oyanedel 1992), y fungicidas (mancozeb 80% WP 2.4 g/l, benomil 50% WP 0.17g/l y captan 80% WP 1.5 g/l).

Jordan y Oyanedel (1992) utilizaron 5 medios de cultivo en combinación con los reguladores de crecimiento zeatina, BAP, kinetina, ANA, ácido giberélico (GA₃) y tidiazurón (TDZ). Para evitar la necrosis del material se utilizó carbón activado (AC) 100-2000 mg/l, PVP-360 Sigma 1-3 g/l, polivinilpolipirrolidone (PVPP-6755 Sigma) 1-3 g/l y ácido ascórbico 28-100 mg/l. Adicionalmente, se usó caseína hidrolizada (500 mg/l) con glutamina (200 mg/l) para el caso de cultivos de pericarpo y sulfato de adenina (40-80 mg/l) para los cultivos de epicótilos de hojas. El medio se ajustó a un pH de 5.7 y luego se autoclavó. Los tratamientos se cultivaron por 7 días en oscuridad seguido por un cambio a un fotoperiodo de 16 horas (57 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz blanca). Estos autores obtuvieron

regeneración en segmentos de brote, meristemas y hojas con segmentos de pecíolo en los siguientes medios: WPM + ANA (0.3 mg/l) + BAP (0.1 mg/l) + AC (100 µM) + ácido ascórbico (28 mg/l), MS + ANA (0.1-1.0 mg/l) + Zeatina (0.1-5.0 mg/l) y MS con TDZ (1.0 mg/l) + ANA (1.0 mg/l), respectivamente.

En *Achras sapota*, Purohit y Singhvi (1998) establecieron la metodología de micropropagación usando segmentos de nódulos de cotiledones, en un medio de Schenk & Hildenbrandt (SH) con BAP en una concentración de 2 mg/l. La semilla se desinfectó con cloruro de mercurio (HgCl₂) por 5 minutos. Se obtuvo la brotación a los 42 días y se mantuvieron en subcultivo 63 días más. La aplicación de GA₃ en los primeros subcultivos favoreció la multiplicación de brotes y no tanto la enlongación de los mismos. El enraizamiento se logró con ácido indol-3-butírico (AIB) (200 mg/l). Posteriormente, Purohit *et al.* (2004a) retomaron la metodología empleada en 1998 y la implementaron para segmentos de hoja. La diferenciación óptima de brotes se obtuvo en un medio de SH suplementado con 2 mg/l de BAP y 1.10 mg/l de TDZ. La histología de los brotes mostró conexión vascular con el tejido que le dio origen.

Purohit *et al.* (2005) obtuvieron brotes adventicios de segmentos de cotiledón de *Feronia limonia* en un medio MS con BAP más kinetina en una concentración de 0.5 mg/l y 0,5 mg/l, respectivamente. La multiplicación de dichos brotes se realizó manteniendo la concentración de BAP, aumentando la de kinetina a 1,5 mg/l y añadiendo ANA en una concentración de 0,01 mg/l. El enraizamiento se hizo, a su vez, en las sales y minerales del MS a un cuarto de su concentración con AIB (1,5 mg/l) en un 1% de sacarosa.

2.2.2.1.2. *Pouteria sapota*

Pocos trabajos se han realizado en el cultivo *in vitro* de *P. sapota*. Roca (1996) trabajó con explantes de meristemo y hoja. En la desinfección de meristemo aplicó etanol (70%) por un

minuto seguido de NaOCl (1.06%) por 15 minutos, más tres lavados con agua destilada estéril e inmersión en ácido cítrico (150 mg/l). En el caso de segmentos de hoja se utilizó etanol (70%) por un minuto, seguido de NaOCl (1.06%) por 10 min.

Los segmentos de meristemo se sembraron luego en un medio de cultivo de MS o de WPM, ambos suplementados con reguladores de crecimiento, ácido cítrico (150 mg/l) y carbón activado (1000 mg/l). Para este tipo de material, el autor manifiesta haber obtenido la diferenciación de brotes, pero éstos presentaron hojas vitrificadas y malformadas, lo que limitó su desarrollo y enlongación e impidió la regeneración y multiplicación de los mismos. En varios medios de cultivo se obtuvo explantes con callo y en otros medios se obtuvo directamente embrioides, sin haber pasado por una fase de callo, pero los que mostraron mayor formación de explantes (60%) fueron los siguientes:

Callos semicompactos con embrioides se produjeron con los siguientes medios:

- Inducción con GA₃ (1 mg/l) en medio líquido con sales de MS y para el desarrollo con 1 mg/l de BAP más 0.5 mg/l de ANA más 0.5 mg/l de GA₃ en un medio sólido con las sales de MS.
- Inducción en medio líquido con GA₃ (1 mg/l) y para el desarrollo con 2 mg/l de BAP más 0.5 mg/l de ANA en medio sólido. En ambos casos se usó WPM.

Los embrioides se produjeron con los siguientes medios:

- Inducción en medio líquido con GA₃ (1 mg/l) y en el medio sólido de desarrollo con 2 mg/l de BAP más 0.5 mg/l de ANA. En este caso se usó un medio MS.

Por su parte, Lobato (1998) intentó la macro y micro injertación en zapote sin tener éxito con material proveniente de la colección de *Pouteria sapota* del CATIE. El trabajo *in vitro* se vio perjudicado por la contaminación bacteriana que se manifestó a lo largo del cultivo,

ahondado por la necrosis. Desinfecciones con concentraciones elevadas de NaOCl no dieron resultado.

3. METODOLOGÍA

3.1. Sitio de recolecta

Los materiales utilizados provinieron de la colección de *P. sapota* del CATIE, ubicado geográficamente a 9°53' de latitud y 83°39' de longitud oeste, Turrialba, Cartago, a una altitud de 602 m.s.n.m, en un valle con una temperatura promedio de 22,3 °C y una precipitación promedio anual de 2600 mm. De acuerdo con la clasificación de zonas de vida de Holdridge, el valle es de tipo “bosque húmedo premontano” (Gazel *et al.* 1999).

3.2. Sitio de trabajo

Los trabajos de germinación y de cultivo *in vitro* se realizaron en el Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio.

3.3. Pruebas de desinfección del material *in vitro*

3.3.1. Explantes utilizados

Se utilizó segmentos de hoja y eje apical de *P. sapta* provenientes de campo y de semilla madura previamente germinados en invernadero, estas últimas con tres meses de edad. El material de campo se procesó el día de recolecta según la metodología descrita más adelante.

En los explantes de campo y de invernadero los procedimientos de desinfección fueron evaluados por separado.

3.3.2. Preparación del material en invernadero

Las plántulas en invernadero se regaron con agua cada ocho días y se fertilizaron cada mes con el fertilizante foliar Bayfolan ® Forte de Bayer (5 ml/l). También se aplicó al suelo Nitrofoska ® Azul 12+12+17+12 de BASF Agro Comercial S.A (1 g. por plántula al mes). Además, se aplicó los funguicidas benomil 50 WP de Agrícola Piscis S.A (metil-1-(butilcarbomoil) banzimidazol-2-il) carbonato 50% p/p, inertes 50%) y Tri-Miltox ® forte 65.8 WP NOVARTIS AGRO, S.A (ditiocarbamato policuprico Mancozeb), así como los bactericidas agrimicin-16,5 WP PFICER S.A (estreptomicina (sulfato) 15,0%, terramicina (oxitetraciclina) 1,5%, inertes 50%) y kilol LDF-100 11 SL CitroBio S.A (bactericida-funguicida)(2.5~anhidro-1-0/4-dimetil/2/2-4-(t,t,3,tetrametibutil)fenoxylloxy/etil/amonio/metil/fenil/hepta3enitolclorido, monoéter con 3-(3hidroxi)-1,2). Estos se aplicaron una vez a la semana en la combinación benomil/agrimicin (3g/l cada uno) y Tri-Miltox/kilol (3 g/l y 3 ml/l respectivamente).

El material de invernadero no se usó hasta después de ser tratado por 2 semanas con los bactericidas y funguicidas, según las dosis y combinaciones mencionadas anteriormente.

3.3.3. Procedimiento de Desinfección I

Los explantes de hoja y eje apical se lavaron con agua a chorro por 10 minutos. En el caso de los ejes apicales se eliminó algunas de las hojas que bordean al meristemo y se dejó solo las 2 últimas hojas que lo cubrían. Luego se remojaron en una solución de detergente en polvo y se cepillaron suavemente. Los residuos de detergente se eliminaron con lavados con agua a chorro.

Posteriormente se desinfectaron en una disolución de benomil y agrimicin, en una concentración de 2 g/l cada uno con 4 gotas de Tween 20® por cada 100 ml por un periodo de 30 minutos, seguido de dos lavados con agua destilada estéril, transcurrido el tiempo se eliminó el líquido. Luego se sumergieron en NaOCl al 0,5; 1; 1,5; 2 y 2,5% con cuatro gotas de Tween 20 ® por cada 100 ml de solución por 20 minutos en cámara de flujo laminar y se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente, las hojas se seccionaron en segmentos de 1 cm² y los ejes apicales de 1 a 2 cm de largo. Luego los explantes se cultivaron.

3.3.4. Procedimiento de Desinfección II

Se evaluó una metodología alterna a la anterior. Los explantes de hoja y eje apical se lavaron con agua a chorro por 10 minutos. En el caso de los ejes apicales, se eliminó algunas de las hojas que bordean al meristemo y se dejó solo las 2 últimas hojas que lo cubren. Luego se remojaron en una solución de detergente en polvo y se cepillaron suavemente. Los residuos de detergente se eliminaron con lavados con agua a chorro.

Luego se sumergieron en una disolución de Tri-Miltox (2 g/l) y Kilol (5 ml/l); además, se añadió 4 gotas de Tween 20® por cada 100 ml. Los explantes se mantuvieron en esta disolución durante 4 horas en agitación. Luego fueron inmersos en NaOCl (1%), más 4 gotas de Tween 20® por cada 100 ml por 20 minutos.

El material se llevó a una cámara de flujo laminar donde se procedió a lavar los explantes tres veces con agua destilada estéril. Las hojas se seccionaron en segmentos de 1 cm² y los ejes apicales de 1 a 2 cm de largo, a éstos se les eliminó las hojas que bordean al meristemo en su totalidad. Mientras se realizaron las disecciones se mantuvo los explantes en agua con PVP (10g/l).

Posteriormente, ambos tipos de explante se les realizó una segunda desinfección con NaOCl (0,25; 0,5; 0,75; 1,00%) por 5 minutos. Luego se lavó el material 3 veces con agua destilada estéril y se cultivaron.

3.3.5. Medio de cultivo utilizado

Los explantes se sembraron en un medio con sales y vitaminas de MS, con 30 g/l de sacarosa, pH 5,8 y 8 g/l de agar.

3.3.6. Agentes bióticos contaminantes

Se identificó a nivel de géneros aquellos agentes bióticos contaminantes que se presentaron en los explantes de hojas y ejes apicales para determinar la eficiencia de la desinfección y la posible presencia de organismos endógenos. La identificación se realizó en el Centro de Investigación en Protección de Cultivos (CIPROC) por parte del Ing. Edgar Vargas †.

3.3.7. Subcultivo y evaluación

En ambas pruebas de desinfección la unidad experimental para las dosis con NaClO consistió de 12 explantes para eje apical y 40 para hoja. Se evaluó la contaminación y la necrosis así como el porcentaje de explantes contaminados por género, así como el porcentaje de explantes total contaminado. Para el análisis de las variables se realizó un análisis de regresión. No se realizó subcultivos durante el periodo de evaluación para descartar la contaminación por manipulación

3.4. Tratamientos con reguladores de crecimiento *in vitro* sobre material proveniente de invernadero.

3.4.1. Material de trabajo y desinfección

Se evaluó la respuesta de segmentos de hoja, eje apical y meristemo lateral, a diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (éstos se especifican en la sección 3.4.2). Dicho material se recolectó del banco de árboles mantenidos en el invernadero del CIGRAS para luego ser desinfectados mediante la Desinfección I descrita en la sección 3.3.3, la concentración de NaOCl utilizada fue de 1%. Asimismo, se continuó con el mismo sistema de mantenimiento de los árboles en invernadero para su utilización *in vitro*.

3.4.2. Medios de cultivo

3.4.2.1. Medio de inducción a regeneración

Los explantes tratados con la Desinfección I se colocaron en un medio de inducción MS o WPM (según el tratamiento) con 1 mg/l de GA₃ (Roca 1996), por 3 días en oscuridad con 8 g/l de agar.

3.4.2.1.a. Medio de regeneración con citoquinina.

Transcurrido el tiempo en el medio de inducción indicado anteriormente, el material se trasladó a un medio de regeneración, el cual constó de diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento (BAP y kinetina) (Cuadro 1). El material permaneció 4 días más en oscuridad y luego se pasó a luz ($7,456 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. Cada unidad experimental de eje apical o meristemo lateral consistió de 12 explantes y de 40 explantes en el caso de hoja.

Cuadro 1. Concentraciones de citoquininas y de PVP en medio WPM utilizado para cultivar hojas, ejes apicales y meristemos laterales de *P. sapota*.

Composición de medio de cultivo: regulador	Antioxidante PVP	Concentración de regulador (mg/l)	Material vegetal utilizado
BAP	0	0	Hoja (n=40)
		0.5	Eje apical y meristemo lateral (n=12)
		1	
		1.5	
		2	
BAP	7g/l	0	Eje apical y meristemo lateral (n=12)
		0.5	
		1	
		1.5	
		2	
Kinetina	7 g/l	0	Eje apical y meristemo lateral (n=12)
		0.5	
		1	
		1.5	
		2	

Nota: la “n” correspondió al número de explantes por concentración.

3.4.2.1.b. Medio de regeneración combinado: citoquinina con auxina.

Trascurrido el tiempo en el medio de inducción, el material se transfirió a un medio de regeneración, el cual constó de diferentes reguladores de crecimiento. Se utilizó 1 mg/l de BAP con 0.5 mg/l de ANA en un medio WPM y también se utilizó 2 mg/l de BAP con 0.5 mg/l de ANA en un medio MS. El material permaneció 4 días más en oscuridad y luego se

pasó a luz ($7,456 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 oscuridad. En cada tratamiento utilizado de eje apical o meristemo lateral se usaron 12 explantes.

3.4.2.2 Medio inductor a callogénesis

Este medio se aplicó solamente a segmentos de hoja. El tratamiento consistió en un medio WPM con diferentes concentraciones de 2,4-D (0; 0,5; 1; 1,5; 2 mg/l). Se mantuvo los explantes en oscuridad 7 días y luego se expusieron a fotoperiodo de 12 horas ($7,456 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Se usaron 40 explantes por tratamiento.

3.4.3. Subcultivo y evaluación

Se subcultivó con una frecuencia de 15 días en el medio respectivo según el tratamiento y se evaluó la contaminación, la necrosis y la formación y desarrollo de estructuras morfológicas en cada tratamiento. Para evaluar los resultados se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para la variable necrosis, hojas activas (hojas no eliminadas durante la Desinfección I que muestran crecimiento *in vitro*), hinchamiento de zona apical y yema activa (abultamiento o hinchamiento de la yema). Además de un análisis de regresión en los casos donde el ANOVA fue significativo.

4. RESULTADOS

4. 1 Desinfección I y II e identificación de contaminantes

4.1.1 Material de campo

Al utilizar ambos tipos de desinfecciones en el material de campo se encontró una amplia gama de contaminantes tanto en hoja como en eje apical. En la Desinfección I en hoja se presentó la aparición de *Phoma* sp., *Pseudomonas* sp. y *Fusarium* sp. (Fig. 3) y en la Desinfección II en el mismo material, se encontró *Dendrophoma* sp., *Isaria* sp., *Phoma* sp., *Kutlakesopsis* sp., *Tubercularia* sp., *Gliomastix* sp., *Mucor* sp., *Phythium* sp., *Chaetaphoma* sp., *Fusarium* sp. y *Deuterophoma* sp. (Fig. 4). Así aunque la diversidad de contaminantes en la Desinfección I fue menor que en la II, los porcentajes de contaminación por género fueron altos, alcanzando el 100% en algunas de las concentraciones de NaOCl (1,5 y 2,5%). En el caso de la Desinfección II disminuyó el porcentaje de contaminación por género pero se presentó gran diversidad, la contaminación no superó el 40% en ninguno de los casos; sin embargo, la contaminación total alcanzó valores entre 70 y 90%.

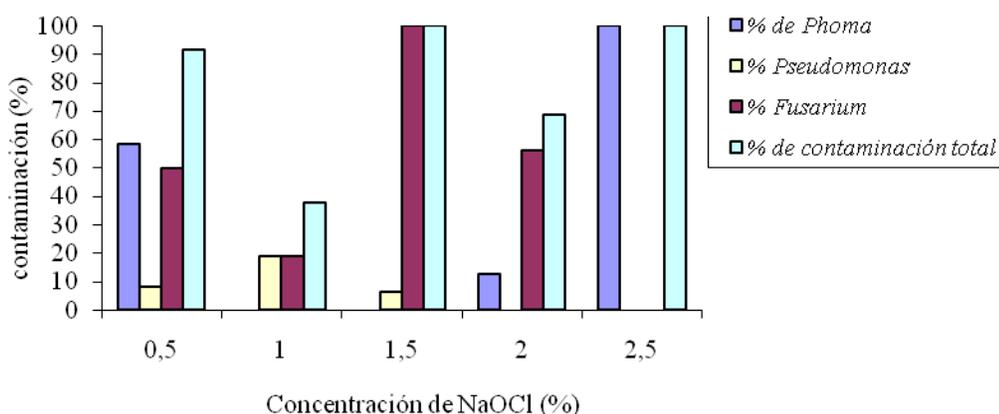


Figura 3. Contaminación de explantes de hoja provenientes de campo de acuerdo a la concentración NaOCl en la Desinfección I en *P. sapota* a los 16 días de cultivo.

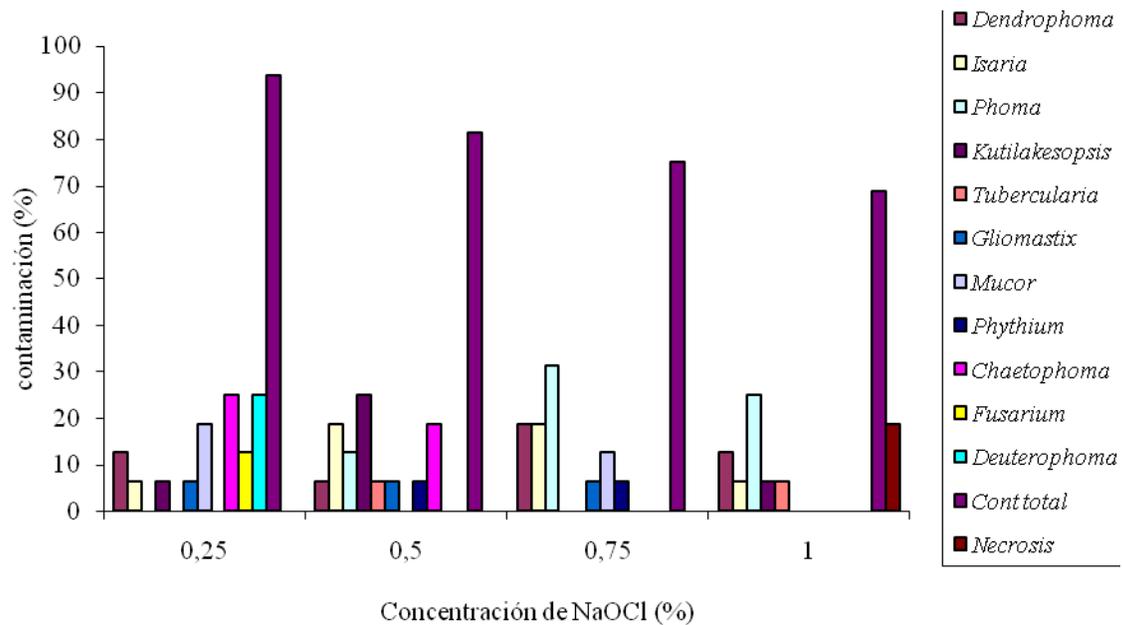


Figura 4. Contaminación de explantes de hoja provenientes de campo de acuerdo a la concentración de NaOCl en la Desinfección II, en *P. sapota* a los 16 días de cultivo.

En la Desinfección I, en eje apical, se encontró sólo *Pseudomonas* sp. y *Fusarium* sp. (Fig. 5) y en la Desinfección II: *Pseudomonas* sp., *Deuterophoma* sp., *Rhizopus* sp., *Dendrophoma* sp., *Fusarium* sp. y *Phoma* sp. (Fig. 6). En el caso de la desinfección I, se encontró que al utilizar concentraciones mayores de NaOCl se presentaron menores contaminaciones totales, llegando a ser cercanas a 30% con la dosis de 2%. Sin embargo, se observó un aumento de explantes con necrosis, alcanzando los mayores valores (100%) en la concentración de 1,5% de NaOCl, mientras que los más bajos (entre 20 y 30%) en 0,5 y 1% a los 16 días de cultivo. Por su parte, en la Desinfección II, los valores en contaminación total y necrosis fueron más altos, siendo en ningún caso menores a 90%.

En general, se observó en hoja una mayor diversidad de géneros que en eje apical. De los géneros presentes en eje apical, únicamente *Rhizopus* sp. no está presente en eje apical.

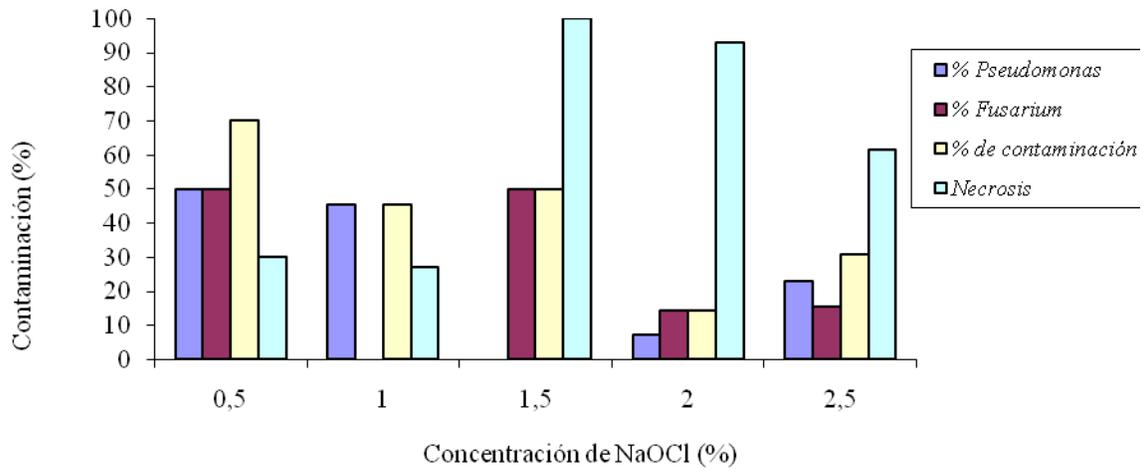


Figura 5. Contaminación de explantes de eje apical provenientes de campo de acuerdo a la concentración de NaOCl en la Desinfección I, a los 16 días de cultivo.

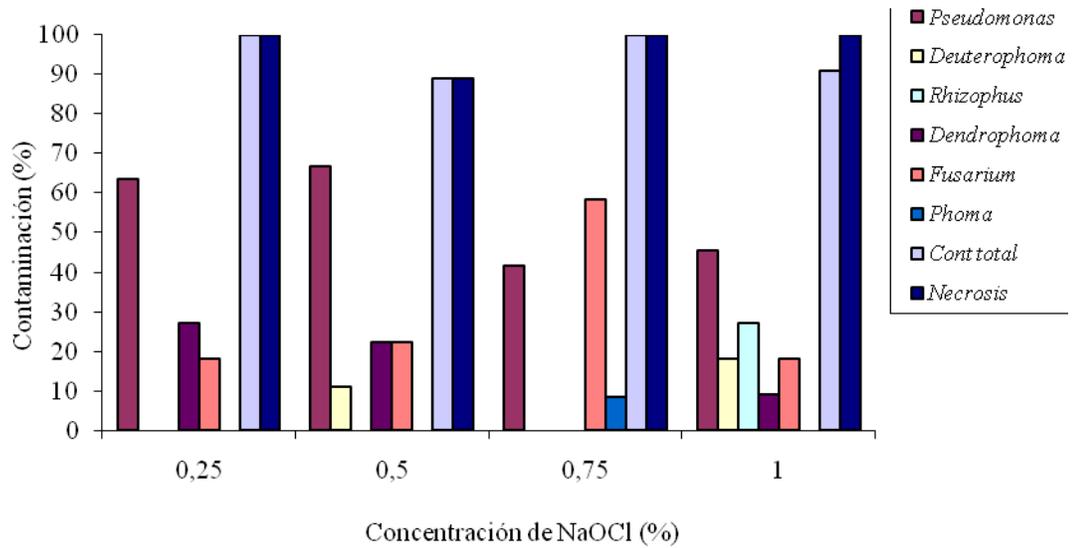


Figura 6. Contaminación de explantes de eje apical provenientes de campo de acuerdo a la concentración de NaOCl en la Desinfección II, a los 16 días de cultivo.

El total de explantes contaminados tanto en hoja como en ápice (Fig. 3, 4, 5 y 6) mostraron traslape de datos, por ejemplo, en algunas de las barras de contaminación total al comparar con la contaminación individual por género, fue mayor la sumatoria del porcentaje de explantes contaminados por género que la barra de contaminación total.

Se realizó un análisis de regresión para determinar la relación entre la dosis de NaOCl y el ataque de hongos en los explantes de hoja. En el caso de la Desinfección I se encontró que la regresión no fue significativa ($p > 0.05$, $R^2 = 0.09$), mientras que por el contrario en la Desinfección II fue altamente significativa ($p < 0.05$, $R^2 = 0,96$) (Fig. 7). En este caso se encontró que conforme aumentó la concentración de NaOCl disminuyó la contaminación fungosa, pero los niveles de contaminación fueron elevados (Fig. 4). En el caso de la contaminación por bacteria en la Desinfección I no se encontró una regresión significativa ($p > 0.05$, $R^2 = 0.46$) y en la Desinfección II no hubo presencia de bacterias con las concentraciones empleadas.

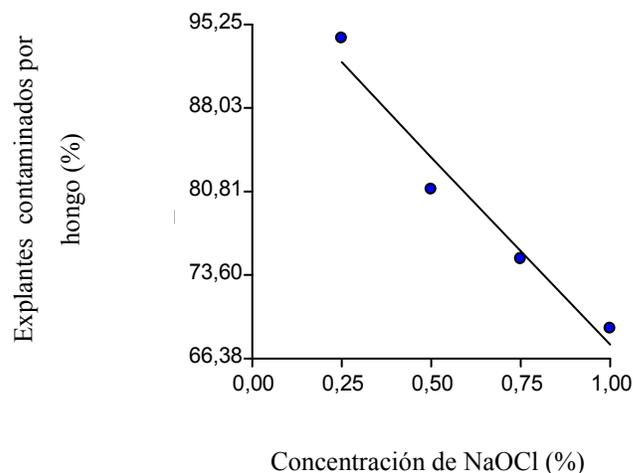


Figura 7. Análisis de regresión en la Desinfección II para determinar la relación del sistema de desinfección con la dosis de NaOCl en el ataque de hongos en los explantes de hoja (provenientes de campo) a los 16 días de cultivo.

En los explantes de hoja no se presentó necrosis durante la evaluación. En la figura 3 se observa como el material de hoja desinfectado con 1% de NaOCl en la Desinfección I obtuvo los menores valores en contaminación y necrosis, 38% y 0% respectivamente.

En el caso de ejes apicales sometidos a la prueba de Desinfección I, no se encontró una tendencia definida, al realizar la prueba de regresión para la contaminación por hongos y bacterias ($p > 0.05$, $R^2 = 0.13$ y 0.38 respectivamente). En la Desinfección II la contaminación por hongos, el análisis de regresión fue significativo y tendió a aumentar al incrementar la concentración de NaOCl ($p < 0.05$, $R^2 = 0.95$) (Fig. 8), en cambio en la contaminación por bacterias disminuyó pero no fue significativo ($p > 0.05$, $R^2 = 0.8$).

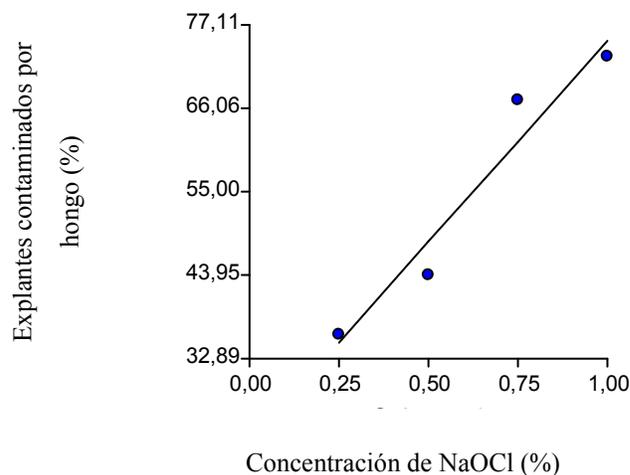


Figura 8. Análisis de regresión en la Desinfección II para determinar la relación del sistema de desinfección con la dosis de NaOCl en el ataque de hongos en el material de eje apical (proveniente de material de campo) a los 16 días de cultivo.

El análisis de regresión en eje apical a su vez mostró que la característica necrosis en la Desinfección I y II no fue significativa ($p > 0.05$, $R^2 = 0.3$ y 0.07 respectivamente). Se observó que en la Desinfección II (Fig. 6) la necrosis fue mayor que en la Desinfección I (Fig. 5) y, en general, la contaminación total también fue mayor. En la Desinfección I, en

eje apical la concentración de 1% de NaOCl se presentó una contaminación del 42% y una necrosis del tejido de 25%, al comparar con las demás concentraciones ésta fue la que presentó menor necrosis aunque no el menor porcentaje de contaminación (Fig. 5).

La concentración de 1% de NaOCl en hoja y eje apical presentó los mejores resultados dentro de las concentraciones empleadas para la Desinfección I, pero el material de campo no permitió la introducción de material *in vitro* de manera eficiente.

4.1.2 Material de invernadero

El material de invernadero presentó menor incidencia de contaminantes así como menor diversidad de los mismos tanto en hoja como en eje apical (Cuadros 2 y 3) con respecto al material de campo anteriormente mencionado. En hoja en material de invernadero se encontró bacilos Gram + alargados no esporulados y *Pseudomonas* sp. y en eje apical se detectó bacilos Gram + alargados no esporulado y *Endomycopsis* sp.

Cuadro 2. Efecto de la Desinfección I en explantes de hoja de *P. sapota* provenientes de invernadero sobre la contaminación y la necrosis después de 16 y 42 días de cultivo *in vitro*.

Desinfección I Concentración de NaOCl	16 días		42 días	
	% Contaminación	% Necrosis	% contaminación	% Necrosis
0,5	No	No	5	75
1	No	No	5	75
1,5	No	No	5	75
2	No	No	0	100
2,5	No	No	0	75

Cuadro 3. Efecto de la Desinfección I en ejes apicales de *P. sapota* provenientes de invernadero sobre la contaminación y la necrosis después de 16 y 42 días de cultivo *in vitro*.

Desinfección I Concentración de NaOCl	16		42	
	% Contaminación	% Necrosis	% contaminación	% Necrosis
0,5	0	8	58	75
1	0	42	25	75
1,5	0	42	0	100
2	0	50	0	100
2,5	0	75	0	100

El análisis de regresión en hoja y en eje apical para la contaminación con la dosis de NaOCl, aunque no fue significativo estadísticamente, mostró una tendencia descendente conforme aumentó la concentración de NaOCl ($p > 0.05$, $R^2 = 0,75$ y $0,70$ respectivamente). Por su parte, la necrosis presentó un comportamiento completamente errático en hoja y en eje apical con una tendencia a aumentar el grado de necrosis conforme aumentó la concentración de NaOCl, aunque ninguna de las regresiones fue significativa ($p > 0.05$, $R^2 = 0.02$ y 0.68).

El tratamiento de Desinfección II no se aplicó ya que la I mostró resultados aceptables, siendo la concentración de 1% de NaOCl la mejor dentro de la gama probada, con un porcentaje de contaminación del 5% en hoja y del 25% en eje apical, la necrosis fue del 75% en ambos casos a los 42 días de cultivo (Cuadros 2 y 3). No se considera que dosis mayores al 1% de hipoclorito de sodio sean mejores, aunque éstas presentaron porcentajes de contaminación menor ya que la necrosis del tejido aumentó considerablemente.

El repetir el procedimiento de la Desinfección I con 1 % NaOCl mostró un aumento en contaminación en el caso de hoja (18%); sin embargo, en eje apical disminuyó a 17% (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto de la concentración de 1% de NaOCl sobre la desinfección de segmentos de hoja y eje apical de *P. sapota* provenientes de invernadero sobre la contaminación y la necrosis (n= 200).

Material	16 días		42 días	
	% Contaminación	% Necrosis	% Contaminación	% Necrosis
Hoja	5	0	18	75
Eje apical	8	33	17	75

Nota: 1. Contaminantes de hoja: a los 16 días: bacilos Gram + no esporulado y 42 días: bacilos Gram + no esporulado y *Pseudomonas*.
2. Contaminantes de eje apical: *bacilos Gram + no esporulado y Endomycopsis*

4.2 Tratamientos con reguladores de crecimiento *in vitro* sobre material proveniente de invernadero.

4.2.1 Hoja

En el caso de hoja, no hubo respuesta al uso de BAP o 2,4-D en ninguna de las concentraciones aplicadas. El material se necrosó conforme transcurrió el tiempo, hasta que después de 40 días de cultivo se descartó. No se observó abultamientos ni dobleces que indicaran algún tipo de división celular producto del cultivo *in vitro*, como se muestra en la Figura 9.

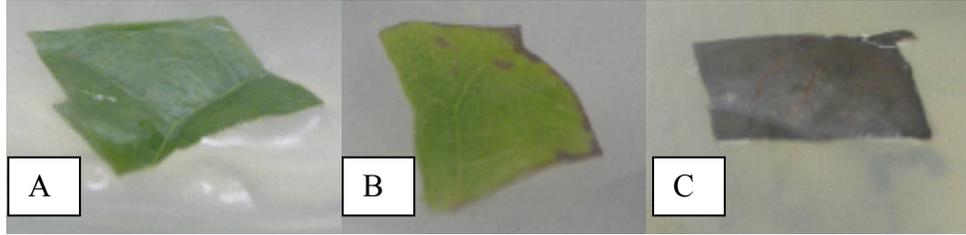


Figura 9. Efecto del período de cultivo *in vitro* en medio WPM con BAP y 2,4-D de secciones de hoja de *P. sapota*. A) Condición inicial. B) A los 15 días de cultivo y C) a los 40 días de cultivo.

4.2.2. Eje apical

4.2.2.1. Tratamiento con BAP y tratamiento con BAP + PVP

Al comparar el efecto del BAP solo y con PVP a los 56 días de cultivo, en los tratamientos sin PVP se observó una menor necrosis, mayores porcentajes de hojas activas e hinchamiento (Cuadro 5). Sin embargo, estos tratamientos no se evaluaron después de 56 días de cultivo debido a que la necrosis aumentó rápidamente hasta alcanzar 100%. Los tratamientos de BAP + PVP se continuaron evaluando después de esta fecha, ya que el material aún presentaba tejido verde, aunque en días posteriores mostraron el mismo problema que el material sin PVP.

El ANOVA de la necrosis no arrojó diferencias significativas entre los tratamientos con BAP y el tratamiento con BAP + PVP ($p > 0.05$), pero sí en el grado de necrosis al indicar que hay mayor porcentaje de explantes según aumenta el grado de necrosis (ANOVA = 90.46, $p < 0.05$). El análisis de regresión para el grado de necrosis fue significativo ($p < 0.05$, $R^2 = 0,65$) (Fig. 10)

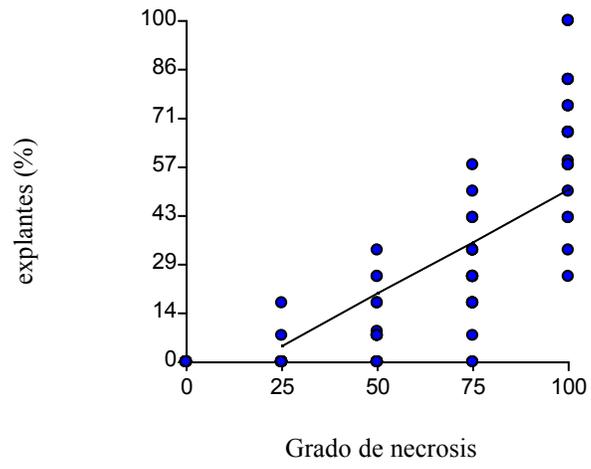


Figura 10. Análisis de regresión del grado de necrosis en el tratamiento de BAP y en el tratamiento de BAP con PVP.

Cuadro 5. Efecto del tratamiento con BAP y del tratamiento con BAP + PVP en ejes apicales de *P. sapota* después de 56 días de cultivo en medio WPM (n = 12 en cada unidad experimental)

Regulador	BAP (mg/l)	Variable				
		Necrosis (%)	Explantes con hojas activas ¹ (%)	Promedio de hojas por explante	Longitud de las hojas activas (cm)	Explantes con hinchamiento (%)
Inducción con 1 mg/l de GA ₃ , tratamiento BAP	0	89	75	2	0,3	33
	0,5	85	50	1	0,3	58
	1	83	33	2	0,3	33
	1,5	82	42	2	1,1	42
	2	79	83	2	1,1	42
Inducción con 1 mg/l de GA ₃ , tratamiento con BAP + 7 g/l de PVP	0	96	18	3	0,3	0
	0,5	96	0	0	0	0
	1	83	75	2	1,3	0
	1,5	92	33	2	1,5	0
	2	100	18	2	0,6	8

Nota: 1. Se llamó a “hoja activa” a aquellas hojas que mostraron crecimiento *in vitro*.

2. Los mejores tratamientos se registran de color gris.

Las hojas preexistentes mostraron aumento en volumen desde los 16 días de cultivo, con y sin PVP. No se encontró una relación directa entre las concentraciones de los tratamientos con BAP y de BAP con PVP en el porcentaje de explantes con hojas activas, de manera que a los 56 días de cultivo, en el caso de el tratamiento de BAP, se obtuvo el mayor número de explantes con hojas activas al utilizar 2 mg/l de BAP (83%), seguido por el testigo (75%). En el tratamiento de BAP con PVP en cambio, los valores alcanzados fueron, en general, considerablemente menores al tratamiento con BAP. El mayor porcentaje de explantes con hojas activas se obtuvo con 1 mg/l de BAP + PVP (75%), seguido de 1,5 mg/l de BAP +

PVP (33%). En la concentración de 0,5 mg/l de BAP no se observaron hojas activas (Cuadro 5). El ANOVA no mostró diferencias significativas en el porcentaje de explantes con hojas activas entre los tratamientos de BAP solo y BAP + PVP ni las entre concentraciones ($p > 0,05$) a los 56 días de cultivo.

Las hojas nuevas aparentemente provinieron de la zona meristemática apical (Fig.11). Las hojas nuevas en el tratamiento con BAP se registraron en la concentración de 1,5 mg/l. A los 40 días de cultivo, se observó 2 hojas preexistentes y 2 hojas nuevas en el explante. Las hojas preexistentes llegaron a medir 3,7 cm y las hojas nuevas 0,3 cm para un promedio de 2 cm (Cuadro 6). Generalmente, la aparición de hojas nuevas se dio por pares, de manera que al formarse y crecer un par nuevo, las hojas preexistentes cesaban su crecimiento y luego se observó su caída. En las concentraciones de 0,5 y 1,5 mg/l se dio caída de hojas preexistentes a los 56 días de cultivo. No se encontraron diferencias significativas entre concentraciones.

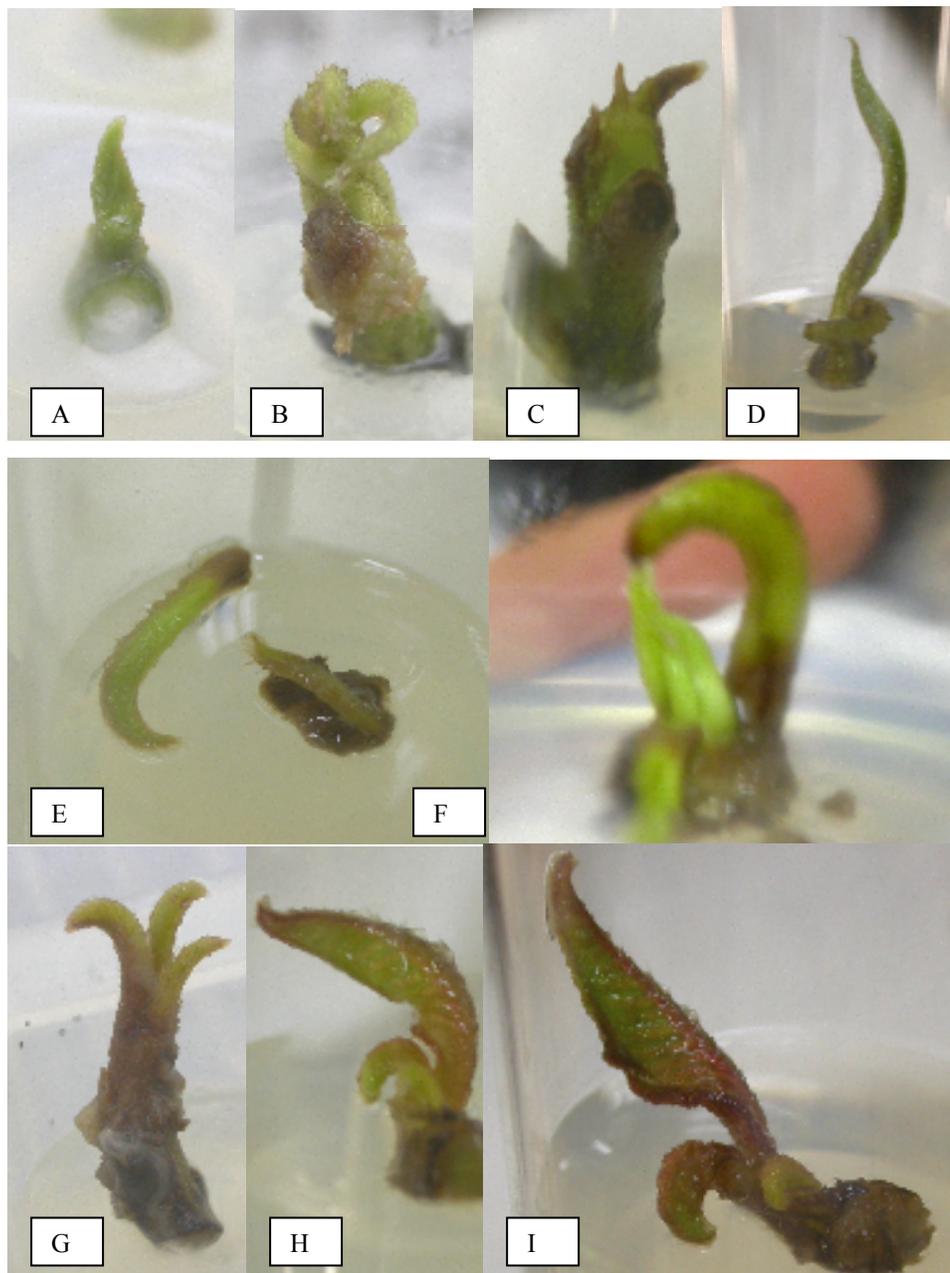


Figura 11. Ejes apicales. Comportamiento general independientemente de los siguientes tratamientos: BAP en la concentración de 1,5 mg/l como en el tratamiento de BAP con PVP en las concentraciones 1-2 mg/l A) Condición inicial. B y C) Crecimiento de las hojas preexistentes que bordean al meristemo e hinchamiento de la zona apical. D) Crecimiento de hojas preexistentes. E) Caída de hojas preexistentes. F y G) Producción de nuevas hojas. H y I) Crecimiento de hojas nuevas.

Cuadro 6. Efecto del tratamiento con BAP sobre la longitud y el número de hojas por explante en ejes apicales de *P. sapota* a través del tiempo.

Concen- tración BAP (mg/l)	Días de cultivo.											
	8		16		24		32		40		56	
	Longitud (cm)	Nº										
0	0	0	0,3	2	0,3	2	0,3	2	0,3	2	0,3	2
0,5	0	0	0	0	0,3	2	0,3	2	0,3	2	0,3	1
1	0	0	0	0	0,3	2	0,3	2	0,3	2	0,3	2
1,5	0	0	0,3	2	0,3	2	0,3	2	2,0	4	1,1	2
2	0	0	0,3	2	0,3	2	0,3	2	2,0	2	1,1	2

En el tratamiento de BAP + PVP se observó un aumento en el tamaño de las hojas a los 40 días de cultivo, además de producirse nuevas hojas en el testigo (Cuadro 7). La aparición de nuevas hojas se dio nuevamente a los 56 días de cultivo en el testigo, donde se observó la caída de hojas de mayor edad. También se observó caída de hojas en la concentración de 2 mg/l de BAP + PVP

Cuadro 7. Efecto del tratamiento de BAP en medio con PVP (7 g/l) sobre la longitud y número de hojas total en cultivo de ejes apicales de *P. sapota*.

BAP (mg/l)	Días de cultivo															
	8		16		24		32		40		48		56		64	
	Long (cm)	Nº	Long (cm)	Nº	Long (cm)	Nº	Long (cm)	Nº	Long (cm)	Nº	Long (cm)	Nº	Long (cm)	Nº	Long (cm)	Nº
0	0	0	0,3	2	0	0	0	0	0,3	2	0,3	2	0,3	3	0,30	3
0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0,3	2	0,3	2	0,3	2	0,4	2	0,4	2	1,3	2	1,7	2
1,5	0	0	0,3	2	0,3	2	0,3	2	0,8	2	1,0	2	1,5	2	1,5	2
2	0	0	0,3	2	0,3	2	0,6	2	1,0	2	0,2	2	0,6	2	0,4	1

Nota: 1. Long= longitud 2. N=número de hojas promedio por explante.

El ANOVA para el número de hojas por explante, así como el tamaño de las hojas promedio por explante no mostró diferencias significativas entre los tratamientos con BAP y con BAP + PVP, ni entre las concentraciones empleadas ($p > 0.05$).

El inicio de hinchamiento de la zona apical en los tratamientos con BAP y el tratamiento con BAP + PVP fue a los 16 días. En el tratamiento con BAP, la concentración de 0,5 mg/l, presentó mayor porcentaje de explantes con esta característica (58%), seguido de 1,5 y 2 mg/l a los 56 días de cultivo (42% en ambos) (Cuadro 5). En el tratamiento con BAP + PVP, a los 56 días, solo se obtuvo un máximo de 8 % de los explantes con hinchamiento con la concentración de 2 mg/l. El ANOVA para la característica de hinchamiento en el eje apical mostró diferencias significativas entre los tratamientos con BAP y el tratamiento con BAP + PVP (ANOVA= 57.6; $p < 0.05$) pero no entre las diferentes concentraciones.

En el tratamiento con BAP, el análisis de regresión de las hojas activas e hinchamiento por explante con respecto a la concentración empleada, no mostró diferencias y los datos fueron

muy dispersos. Por su parte, el tratamiento con BAP + PVP, aunque tampoco mostró diferencias significativas, tendió a presentar datos dispersos y ascendentes con respecto a la concentraciones del regulador. Los valores del R^2 en ambos casos fueron menores a 0,5.

4.2.2.2. Tratamiento con kinetina + PVP

La necrosis se inició a los 8 días de cultivo y aumentó progresivamente. La necrosis alcanzó 80% con la concentración de 0,5 mg/l y 100% con la concentración de 1,5 mg/l en el tratamiento con kinetina + PVP a los 48 días de cultivo. (Cuadro 8). El ANOVA no mostró diferencias significativas para necrosis entre las dosis empleadas de kinetina.

Cuadro 8. Efecto del tratamiento con kinetina + PVP en eje apical después de 48 días de cultivo (n = 12 explantes en cada unidad experimental)

Medio de cultivo: WPM	Concentración de kinetina (mg/l)	Necrosis (%)	Explantes con hojas activas (%)	Promedio de hojas por explante	Longitud promedio de hojas (cm)	Explantes con hinchamiento (%)
Inducción con 1 mg/l de GA ₃ . Tratamiento Kinetina + PVP 7g/l	0	92	8	2	0,1	17
	0,5	80	25	3	1,1	42
	1	96	17	2	0,1	0
	1,5	100	8	4	0,7	25
	2	96	25	3	0,5	33

Nota: 1. Los mejores tratamientos se registran de color gris con puntos.

Las hojas preexistentes comenzaron a mostrar aumento de volumen después de 8 días de cultivo en las concentraciones de 0,5, 1,5 y 2 mg/l solamente y en el testigo y en la dosis de 1 mg/l hasta el día 48 de cultivo (Cuadro 9). Se dio formación de nuevas hojas al día 40 de cultivo en 0,5, 1,5 y 2 mg/l y en la concentración de 1,5 se observó 4 hojas por explante en el 8% de los explantes (Cuadro 9). Se presentó un 42% de hinchamiento de la zona apical en la concentración de 0,5 mg/l kinetina a los 48 días (Cuadro 8).

Cuadro 9. Efecto del tratamiento con kinetina + PVP sobre la longitud y el número de hojas por explantes en eje apical de *P.sapota*.

Concentración kinetina (mg/l)	Días de cultivo											
	8		16		24		32		40		48	
	Longitud (cm)	Nº	Longitud (cm)	Nº	Longitud (cm)	Nº	Longitud (cm)	Nº	Longitud (cm)	Nº	Longitud (cm)	Nº
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	2
0,5	0,3	2	0,7	2	0,7	2	1	2	0,7	2	1	3
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	2
1,5	0,3	2	0,4	2	1	2	1	3	0,7	4	0,7	4
2	0,3	2	0,5	2	0,5	2	1	1	0,6	2	0,5	3

Tanto la variable de hojas activas como el hinchamiento por explante tendieron, según el análisis de regresión, a ser ascendentes con respecto a la concentración del regulador de crecimiento pero presentaron R^2 muy bajas ($p > 0.05$), lo que indica datos dispersos.

El ANOVA no detectó diferencias significativas entre las características de hojas activas, hinchamiento del eje apical, número de hojas por explante y tamaño promedio por explante entre las concentraciones empleadas de kinetina.

Se realizó un ANOVA para hojas activas entre los tratamientos de BAP y kinetina, donde se encontró diferencias significativas (ANOVA = 57.6; $p < 0.05$). Para BAP el número de explantes con hojas activas fue de 57% y para kinetina 17%. En el caso del ANOVA para BAP + PVP y kinetina no se encontró diferencias significativas para la misma característica. El ANOVA no mostró diferencias significativas en hinchamiento del eje apical, número de hojas por explante y tamaño promedio de la hoja por explante al comparar el tratamiento con kinetina, con BAP y con BAP + PVP.

4.2.2.3 Tratamiento con BAP + ANA

Se observó un mayor porcentaje en el número de explantes con hojas activas y en el porcentaje de explantes con hinchamiento con el tratamiento de 1 mg/l de BAP + 0.5 mg/l de ANA en medio WPM con respecto al tratamiento de 2 mg/l de BAP + 0.5 mg/l de ANA en un medio MS. La necrosis en el primero fue menor (Cuadro 10). Los datos de hojas activas e hinchamiento en los tratamientos con BAP, BAP + PVP y con Kinetina + PVP fueron mayores que en las combinaciones de BAP y ANA.

Cuadro 10. Efecto de los tratamientos con BAP + ANA en ejes apicales de *P. sapota* después de 32 días cultivo (n = 12 explantes en cada unidad experimental).

Composición de medio de cultivo:	Necrosis promedio (%)	Explantes con hojas activas (%)	Promedio de hojas por explante	Longitud promedio (cm) de las hojas	Explantes con hinchamiento (%)
Inducción : 1 mg/l de GA ₃ . Tratamiento: 1 mg/l de BAP + 0.5 mg/l de ANA en WPM	25	58	2	0,3	33
Inducción: 1 mg/l de GA ₃ , Tratamiento: 2 mg/l de BAP + 0.5 mg/l de ANA en MS	56	25	2	0,4	25

4.2.3. Meristemo lateral

4.2.3.1. Tratamiento con BAP y con BAP + PVP

La necrosis en los tratamientos con BAP y BAP + PVP se inició a los 8 días de cultivo y aumentó en forma progresiva (Cuadro 11). A los 40 días, se observó la menor incidencia de necrosis (69%) con la concentración de 1 mg/l de BAP. En cambio el tratamiento con PVP

mostró 90% de necrosis con la misma concentración y al cabo de los mismos días de cultivo. El ANOVA no mostró diferencias significativas para necrosis entre los tratamientos de BAP solo y con PVP.

Cuadro 11. Efecto del uso de BAP y BAP + PVP en meristemos laterales de *Pouteria sapota*, después de 40 días de cultivo (n = 12 explantes en cada unidad experimental)

Medio de cultivo WPM	Concentración de BAP (mg/l)	Variable			
		Necrosis Promedio (%)	Explantes con yema activa (%)	Explantes con primordios (%)	Explantes con callo (%) y peso promedio (gr.)
Inducción: 1 mg/l GA ₃ . Tratamiento: BAP	0	81	33	0	0
	0,5	89	42	0	0
	1	69	58	8	8 (0.48 g)
	1,5	95	50	0	0
	2	88	58	0	0
Inducción: 1 mg/l GA ₃ . Tratamiento: BAP + 7 g/l de PVP	0	88	17	0	0
	0,5	93	0	0	0
	1	90	17		
	1,5	100	0	0	0
	2	100	0	0	0

Nota 1. Los tratamientos más relevantes se muestran en puntos grises

Los explantes provenientes de meristemos laterales en cultivo con 1 mg/l de BAP formaron primordios pero éstos no crecieron y el tejido se necrosó (Fig. 12 de A-C). Además, se evidenció que las yemas se abultaron a los 8 días pero no dieron formación a ninguna estructura organogénica. En los tratamientos de BAP con PVP no se observó tampoco respuesta (Cuadro 11).

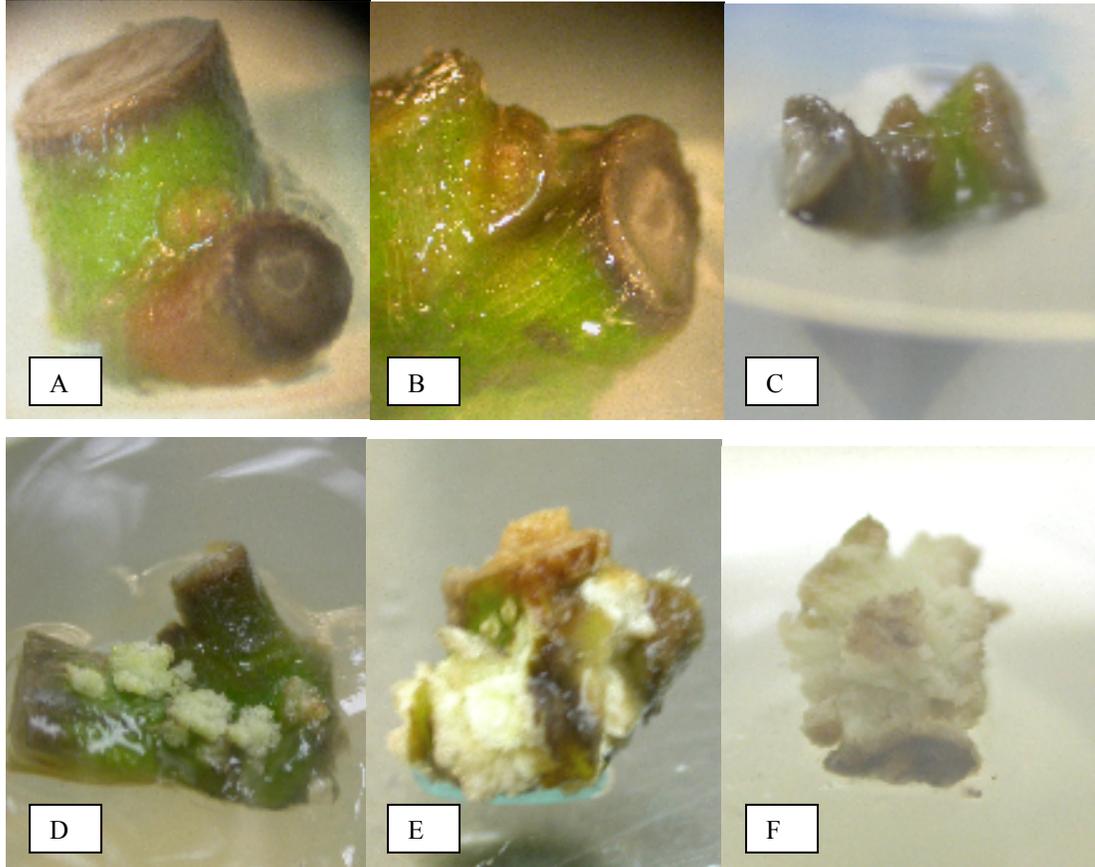


Figura 12. Meristemo lateral. Primordios: A) Condición inicial. B) Se observó dos proyecciones, “primordios”. C) las proyecciones “primordios”, crecen un poco y luego sufre necrosis. D) Se forma callo por secciones del explante luego crece y forma una sola estructura aparente. E) El explante se abre y emerge el callo el cual crece y bordea el peciolo hasta rodear todo el explante. F) Separación del callo del explante

Un 8% de los explantes con 1 mg/l de BAP sin PVP formó a los 24 días de cultivo callo. El callo se formó por secciones del explante que al crecer formaron una sola estructura (Fig. 12 D y F) o también se observó que el explante se abrió para dar lugar al callo emergente (Fig. 12 E). El color del callo fue blanco con proyecciones a la superficie del callo, estas proyecciones segregaron en unidades más pequeñas y no regeneraron ninguna estructura organogénica en el mismo medio que les dio origen (Fig. 12 F). A los 32 días el callo pesó

en promedio 0,48 gramos y conservó las características mencionadas anteriormente (Cuadro 11).

El ANOVA mostró diferencias significativas entre los tratamientos de BAP solo y de BAP con PVP con respecto a yema activa (ANOVA= 0.91 $p < 0.05$).

4.2.3.2. Tratamiento con kinetina y PVP

En este tratamiento la necrosis inició a los 16 días y aumentó progresivamente por lo que el material se descartó a los 40 días de cultivo.

La presencia de explantes con yema activa inició a los 8 días en todas las concentraciones y se mantuvieron hasta los 32 días para luego decaer. En ausencia de kinetina se observó la formación de callo a los 24 días en el 8% de los explantes. Así, a los 32 días de cultivo esto aumentó a un 25% (Cuadro 12).

Los callos formados presentaron color blanco con proyecciones paralelas al centro del callo las cuales se desmoronaban (Fig. 12 F). Además, éstos no regeneraron en ninguna estructura organogénica en el mismo medio en el cual se formó, ni en otras concentraciones probadas (1 y 2 mg/l de kinetina).

Los callos pesaron en promedio 0,54 gramos a los 32 días de cultivo. El inicio de formación de estos callos se dio de igual modo que en el tratamiento de BAP sin PVP (Fig 12 D, E y F).

Cuadro 12. Efecto del tratamiento con kinetina con PVP para explantes de meristemo lateral a los 32 días de cultivo (n = 12 explantes en cada unidad experimental)

Composición de medio de cultivo: WPM	Concentración de regulador (mg/l)	Necrosis Promedio (%)	Explantes con yema activa (%)	Expantes con callo (%) / peso promedio (gr.)
Inducción con GA ₃ , tratamiento con Kinetina + PVP 7g/l	0	42	25	25 (0.54)
	0.5	79	17	0
	1	85	25	0
	1.5	88	25	0
	2	95	0	0

Nota

1. Los tratamientos relevantes se muestran en puntos grises

El ANOVA mostró diferencias significativas en cuanto a la característica de yema activa entre el tratamiento de kinetina con el tratamiento de BAP (ANOVA= 0.79, $p < 0.05$), pero no hubo diferencias significativas entre kinetina y BAP + PVP.

4.2.3.3. Tratamiento con BAP y ANA

Se evidenció una mejor respuesta en el tratamiento de inducción con 1 mg/l de GA₃, con 1 mg/l de BAP + 0.5 mg/l de ANA en un WPM al comparar con el tratamiento con 2 mg/l de BAP + 0.5 mg/l de ANA en un MS. La necrosis en el primero fue menor (34%) y el porcentaje de explantes con yema activa mayor (25%); además, se observó que un 25% de los explantes formaron callo (Cuadro 13). El callo presentó las mismas características de los callos formados en los tratamientos anteriores (BAP sin PVP y BAP con PVP).

Cuadro 13. Efecto del uso de BAP + ANA para meristemo lateral a los 32 días (n= 12 explantes en cada unidad experimental).

Composición de medio de cultivo:	Variable			
	% Necrosis promedio	% de explantes con yema activa	% de explantes con primordios	% de explantes con callo
Inducción: 1 mg/l de GA ₃ , Tratamiento: 1 mg/l de BAP + 0.5 mg/l de ANA en un WPM	34	25	0	25
Inducción: 1 mg/l de GA ₃ , Tratamiento: 2 mg/l de BAP + 0.5 mg/l de ANA en un MS	52	0	0	0

Nota 1. Los tratamientos relevantes se muestran en puntos grises

5. DISCUSIÓN

5. 1 Pruebas de desinfección e identificación de contaminantes

5.1.1 Material de campo

Durante las pruebas de desinfección de los materiales procedentes de plantas en el campo se encontró una gran diversidad de hongos. Esto fue mayor en el material de hoja que en eje apical en ambas pruebas de desinfección. Además, la diversidad de contaminantes en ambos tipos de materiales fue mayor en la Desinfección II que en la Desinfección I (Fig. 3-6). No se puede asegurar mayor efectividad de la Desinfección I debido a que las pruebas de desinfección no se realizaron de manera simultánea por lo que las condiciones pudieron ser distintas (inoculo en el explante, exposición a condiciones climatológicas diferentes entre otras).

En ambos casos (hoja y eje apical), tanto en la Desinfección I como en la II, los porcentajes de contaminación fueron imprácticos para su introducción *in vitro*. La aplicación de bactericidas y funguicidas en campo no resulta adecuada para nuestro país por sus condiciones climatológicas. Se podría realizar la injertación del árbol de interés en campo y llevar el injerto al invernadero donde se realice el riego directo al sustrato, se abone y se fumigue de la manera adecuada. Lo anterior, facilitaría las labores de desinfección a nivel de laboratorio, aparte de que permitiría reducir la concentración de NaOCl. Se observó que concentraciones altas de esta sustancia aumentan los porcentajes de necrosis. Por otro lado, se podría realizar la metodología de la Desinfección II pero sustituir los agentes bactericidas y fungicidas empleados (Tri-Miltox y Kilol) por los utilizados en la Desinfección I (benomil y agrimicin).

Las dificultades durante la desinfección de esta especie han sido reportadas por autores como Lobato (1998), quien trabajó con material proveniente de campo y logró 0% de contaminación por hongo y bacteria con 37% de oxidación de los explantes. A pesar de estos resultados, la autora menciona que la contaminación varió con respecto al tiempo de cultivo *in vitro*, ya que si bien inicialmente fue de 0% ésta aumentó hasta constituir un obstáculo fuerte para la obtención de material sano a largo plazo.

Ya sea que se pruebe de nuevo las metodologías de este trabajo dando mantenimiento previo a la plantación en campo o que se plantee una metodología nueva, la eficiencia de las disoluciones se puede incrementar al maximizar el contacto y eliminar burbujas de la superficie del explante por medio del vacío. No obstante, esto puede también incrementar la necrosis al provocar daños en el tejido. Por su parte, Skirvin *et al.* (1999) mencionan que al utilizar disoluciones de cloro con su pH regulado produce buenos resultados en la disminución de la contaminación por bacteria (no se indican pH ni las plantas utilizadas). Los autores indican que aunque a los productos comerciales de NaOCl se les regula el pH a 7, en disoluciones no diluidas no se les deben añadir soluciones ácidas debido a que se produce gas cloruro el cual puede ser mortal para los tejidos vegetales.

Otras variantes metodológicas que se podrían evaluar en la desinfección son la combinación de antibióticos, funguicidas, bactericidas y alcohol (este último facilita el contacto del desinfectante) (Leifert *et al.* 1994 y Niedz y Bausher 2002). Cada vez se ha vuelto más frecuente el uso de compuestos antimicrobianos (los cuales no penetran en el tejido) que impidan el crecimiento de contaminantes durante el periodo en que el material se encuentre en cultivo *in vitro*, por ejemplo, el Plant Preservative Mixture (PPM) (Niedz y Bausher 2002).

Además, se podría evaluar el uso de otros agentes desinfectantes no probados en este trabajo como el hipoclorito de potasio (KOCI), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o el cloruro de mercurio (HgCl₂) (Skirvin *et al.* 1999).

Los datos de contaminación variables de acuerdo a la concentración de NaOCl pueden deberse a diferencias en el material genético así como a factores azarosos. Además, la aparición en este trabajo, de una mayor cantidad y diversidad de hongos que de bacterias *in vitro*, puede deberse a que en el medio de cultivo existió competencia entre ambos tipos de microorganismo, y los hongos soportan mejor el pH del medio (5,8). Según Leifert *et al.* (1994) cuando los hongos crecen simultáneamente con bacterias en el medio, éstas no crecen, debido a que los hongos acidifican el medio hasta valores de 3 o menos. Los microorganismos tienden a producir sustancias anti-competidoras. También, se ha observado sinergismo entre microorganismos, algunos crecen mejor cuando otro género se encuentra presente (Leifert *et al.* 1994). Hongos filamentosos y levaduras raramente permanecen latentes *in vitro* ya que el medio provee todos los nutrientes esenciales requeridos para su crecimiento por lo que aparecen en los primeros días de cultivo (Leifert y Cassells 2001).

De los contaminantes identificados *in vitro* en este trabajo, *Phoma* sp. es patógeno de plantas (Leifert *et al.* 1994), *Pseudomonas* sp. (Gram -) no es patógeno de plantas y según la literatura su aparición *in vitro* se debe a una desinfección ineficiente (George 1993 y Leifert y Cassells 2001). La contaminación por parte de organismos microbiológicos tiende a ser una de las causas más importantes de la pérdida de material en laboratorios de cultivo tanto de experimentación como comerciales, sin embargo, no se reconoce la magnitud de los daños que estos causan (Leifert y Cassells 2001).

5.1.2. Material de invernadero

Los niveles de contaminación en el invernadero fueron menores tanto a nivel de hoja como de eje apical; también la diversidad de microorganismos fue considerablemente menor. Estos resultados permiten pensar que los tejidos se encontraban más sanos y libres de saprofitos debido a que las plantas de donde se tomaron los explantes estuvieron bajo condiciones ambientales reguladas, con aplicaciones periódicas de fungicidas y bactericidas, riego directo al sustrato y bajo techo, lo que favorece una mayor sanidad. Asimismo, Purohit *et al.* (2004b) indican que bajo estas condiciones el desarrollo de las plantas suele ser más homogéneo. No obstante, se observó la aparición de bacterias tales como: bacilos Gram + alargados no esporulados, *Pseudomonas* sp. y *Endomicopsis* sp. que sobrevivieron a la desinfección y que se mostraron después de un mes de cultivo (sin realizar subcultivos en ese lapso) (Cuadros 2 y 3). Las bacterias bacilos Gram + no esporuladas mostraron una baja frecuencia de aparición en los explantes y crecieron alrededor del mismo formando un halo de color rosado y tendió a tornarse rojizo con el tiempo. Lo anterior, no permite afirmar que son bacterias endógenas. Se pudo haber confirmado mediante serología, microscopía electrónica, hibridación de ácidos nucleicos y técnicas moleculares basadas en PCR (Leifert y Cassells 2001).

La literatura indica, que bacterias Gram + pueden presentarse como producto de una ineficiente esterilización del medio o esterilización de los instrumentos y de la implementación inadecuada de técnicas asépticas del operador (Leifert y Cassells 2001). Se debe considerar también otras posibilidades como una desinfección ineficiente (presencia de *Pseudomonas* mencionado anteriormente), que las concentraciones empleadas en invernadero de bactericidas y fungicidas, así como la frecuencia de aplicación no hayan sido las adecuadas, un inóculo alto y una humedad relativa en el invernadero elevado. Además, la superficie de toda la planta posee una fuerte pubescencia lo que impide el contacto del bactericida con la superficie de la hoja y el eje apical, esto se puede mejorar con el uso de un agente surfactante en trabajos futuros.

La dificultad con las infecciones bacterianas estriba en que pueden no ser detectadas rápidamente y que no producen síntomas de infección, ya que no crecen en el medio debido a que requieren de ciertas vitaminas o porque la acidez del medio o exudados antibacterianos reducen su crecimiento (Skirvin *et al.* 1999 y Leifert y Cassells 2001). Las bacterias latentes pueden reducir el crecimiento *in vitro* y la tasa de enraizamiento o su latencia puede permanecer hasta llevar las plántulas regeneradas al campo. Sin embargo, la virulencia puede activarse por cambios en la composición del medio, temperatura, pH o la transferencia al invernadero (Leifert y Cassells 2001).

Los niveles de contaminación podrían disminuir aún más al aplicar una segunda desinfección como se planteó en la Desinfección II en el material de campo, la cual no se aplicó en este trabajo para el material de invernadero.

El efecto del NaOCl como agente desinfectante fue bastante errático, aunque se encontró una tendencia, significativa a que dosis mayores promovieron un mejor control de los patógenos. Sin embargo, no se logró un control eficiente de los microorganismos, que permitiera un alto grado de asepsia para el cultivo *in vitro*.

5.2. Reacción del material de invernadero a diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento *in vitro*

Para diversas especies de árboles, la obtención de una adecuada metodología de micropropagación podría contribuir a estudiar otras técnicas *in vitro* para desarrollar nuevas variedades con mayor éxito y rapidez que por métodos tradicionales. A pesar de esto, el cultivo *in vitro* de especies maderables puede durar décadas para obtener un resultado satisfactorio (Jha y Das 2004). Los árboles perennes maderables como *Pouteria sapota*, donde los brotes crecen estacionalmente, son caracterizados por tener un fuerte crecimiento

y de forma episódica (brotes crecen de forma monopodial) y son problemáticos para su cultivo *in vitro* (McCown 2000).

5.2.1. El medio de cultivo

En todos los tratamientos en donde se utilizó solo un regulador de crecimiento fue utilizado el medio WPM. En el caso de los tratamientos donde se combina reguladores de crecimiento: BAP y ANA, no es comparable un tratamiento con otro debido a que se usó dosis diferentes de BAP.

No se realizó una sistematización de tratamientos donde se debía considerar la variante del medio de cultivo a utilizar. Lo anterior hubiese sido de gran utilidad para decidir cual medio era el adecuado para el cultivo *in vitro* de *P. sapota*. La inducción de morfogénesis en especies de árboles frutales tropicales generalmente se ha realizado en medios Murashige y Skoog (1962) (MS) o Wood Plant Medium (WPM) (Singh *et al.* 2004), pero también se pueden utilizar otros medios de cultivo. Por ejemplo, se ha logrado obtener brotes y enraizar *Anacardium occidentale* tanto en MS como en SH a partir de ejes apicales (Jha y Das 2004)

5.2.2. A nivel de hoja

No se observó ningún efecto de los reguladores del crecimiento sobre el desarrollo de estructuras al utilizar hojas como explantes. Aunque se indica en la literatura que el uso de citoquininas estimulan la división celular y la formación de brotes adventicios (Gaspar *et al.* 1996), la aplicación de BAP no produjo este efecto. Con la auxina sintética 2,4-D, que es utilizada *in vitro* para la inducción de callo, tampoco se observó ningún efecto.

La tasa de regeneración depende de la naturaleza del explante, composición del medio de cultivo y las condiciones físicas en el cual crece (Singh *et al.* 2004). El principal factor que

impide la estabilización es la baja obtención de rejuvenización, donde suele ocurrir que no se dé una completa reversibilidad de la fase adulta. Se entiende por estabilización a la etapa en la cual los brotes generados mantienen un crecimiento, uniforme y continuo (McCown 2000). No obstante, se ha reportado regeneración de brotes de explantes de hoja en *Annona squamosa*, *Garcinia mangostana*, *Carica papaya*, *Mangifera indica* (Singh *et al.* 2004) y *Achras sapota* (Purohit *et al.* 2004a) entre otras.

5.2.3. A nivel de eje apical

Las hojas observadas en los ejes apicales, originadas *de novo*, podría deberse a que las células del meristemo siguen un programa determinado, el cual persiste bajo las concentraciones empleadas de los reguladores de crecimiento en este trabajo, por lo que no se produce una desdiferenciación de la fase adulta la cual conlleve a la formación de órganos o estructuras diferentes a las programadas genéticamente (George 1993). Sin embargo, se debe considerar, además, que para la formación de órganos o estructuras haya faltado otro tipo de regulador de crecimiento que completara el desarrollo de estos. Purohit *et al.* (2004a), en sus ensayos con *Achras sapota*, menciona que la fuerte dominancia apical en este árbol necesitó de concentraciones altas de BAP. Se utilizó 2 mg/l de BAP y 1.10 mg/l de TDZ con lo cual obtuvieron diferenciación de brotes. En el presente trabajo se usó dosis similares de BAP, pero no se obtuvo regeneración de brotes. Cabe mencionar que la respuesta es diferente según la especie con la que se trabaje, el genotipo utilizado y la época de colecta del material (estado fisiológico).

En el presente trabajo se dio formación de hojas en la concentración de 1,5 mg/l de BAP (Cuadro 6) y en 0,5, 1,5 y 2 mg/l de Kinetina con PVP (Cuadro 9) y en cuanto a las hojas preexistentes se presentaron crecimiento en casi todos los tratamientos

5.2.4. A nivel de meristemo lateral

Si bien, el uso de diferentes reguladores de crecimiento empleados en este trabajo no condujo a la formación de estructuras organogénicas, sí se dio la formación de callo en meristemos laterales. Éste fue de color blanco con proyecciones paralelas hacia el centro, las cuales se desprendían fácilmente. Esto se observó con la concentración de 1 mg/l de BAP (Cuadro 11) y en el tratamiento con 1 mg/l de BAP + 0.5 mg/l de ANA (Cuadro 13) en medio WPM. Sin embargo, la formación de callo también se observó en el testigo del tratamiento con kinetina (Cuadro 12), el testigo no poseía kinetina. El efecto de las citoquininas, como el BAP y la kinetina según la literatura consiste en estimular la división celular (Gaspar *et al.* 1996) además el BAP interrumpe la replicación cromosomal del ADN y reprograma el destino del desarrollo a un gran número de células en el eje apical (Purohit *et al.* 2004b). El ANA promueve la organogénesis (Gaspar *et al.* 1996). Se debe tomar en cuenta que la generación de callo en el testigo se podría considerar como parte de la rejuvenización causada por las constantes podas en invernadero (George 1993), lo cual se observó al manifestarse brotación doble por cada yema en las plántulas de invernadero. O bien, el callo se podría haber formado en respuesta a heridas como se ha observado durante la injertación (Lobato 1998).

5.2.5. Efecto del PVP

En el presente trabajo se observó que los explantes de eje apical y meristemo lateral presentaron oxidación y necrosis, lo cual se trató de prevenir con el uso de PVP. Sin embargo, no se apreció un efecto positivo en la reacción del material al utilizar este producto. En eje apical se observó que en las diferentes concentraciones de BAP con PVP (Cuadros 11) y Kinetina con PVP (Cuadros 12) había un porcentaje menor de explantes con hojas mostrando incremento en volumen, así como mayor porcentaje de explantes con niveles altos de necrosis con respecto a los resultados obtenidos en las diferentes concentraciones de BAP que no contenían PVP. La literatura dice que el PVP actúa adsorbiendo los fenoles a través de uniones hidrógeno, previniendo la oxidación y

polimerización de éstas sustancias expeditas por el explante, y así las enzimas oxidativas no se unen a éstos agentes reductores (George 1993).

Los fenoles pueden oxidar las auxinas, aumentan la producción de callo, promueven la formación de raíces adventicias y se da en presencia de éstos una formación más efectiva de brotes y una tasa de proliferación más alta (George 1993). Sin embargo, los fenoles pueden provocar daños *in vitro*, interfiriendo con la acción de los productos de los genes codificantes (McCown 2000).

Para determinar si el PVP es un agente efectivo contra la necrosis se debe realizar más ensayos con concentraciones diferentes a las empleadas en este trabajo, considerar además realizar ensayos con explantes de diferente estado fisiológico (madurez). También se puede utilizar carbón activado como agente adsorbente, para limitar el efecto nocivo de los fenoles.

5.2.6. Consideraciones para investigaciones futuras

Como se señaló anteriormente, los resultados obtenidos en este trabajo muestran un efecto de los reguladores del crecimiento sobre la organogénesis en *P sapota*, sin embargo, se hace necesario complementar este trabajo con experimentos adicionales que permitan obtener plántulas completas en forma directa o indirecta. Se debe tener presente que la tasa de regeneración depende de las características propias de la especie, de la naturaleza del explante, la composición del medio de cultivo y las condiciones físicas de crecimiento (Singh *et al.* 2004), por lo que se debe seguir investigando otros medios de cultivo, tipos de explante, condiciones de luz, temperatura, pH y nivel de sacarosa. Algunas especies leñosas solo han sido propagadas *in vitro* con éxito cuando se utiliza material de árboles maduros, otros de tejido joven o sólo de embriones o plántulas con poco tiempo de germinadas (Jha y Das 2004). En un estudio realizado por Purohit y colaboradores (2004 b), en su revisión de literatura indican que existe un efecto en la respuesta del explante dependiendo de la

estación de colecta con respecto a la brotación *in vitro* en varias especies de árboles (*Tectona grandis*, *Psidium guajava*, *Tecomella undulata*, *Prosopis cineraria* y *Wrightia tinctoria*). Además demostraron en *Wrightia tinctoria* que existen diferencias de respuesta a la micropropagación dependiendo si el explante es colocado de forma horizontal o vertical sobre el medio.

Finalmente, aunque no se logró la multiplicación *in vitro* de *P. sapota* sí se establecieron las bases para llevar a cabo este tipo de trabajo y se logró información valiosa en cuanto a problemas con microorganismos, sistemas de desinfección, problemas de oxidación y efecto de reguladores del crecimiento, así como la producción de callo.

6. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron mejores resultados de desinfección al utilizar material proveniente de invernadero que al utilizar material proveniente de campo.
- Los datos obtenidos al utilizar diferentes explantes (hoja, eje apical y meristemo lateral) y los reguladores empleados fueron muy variables debido posiblemente a la diferencias de genotipo y a la época de recolecta (estado fisiológico), por lo que se debe seguir investigando una metodología de micropropagación.

7. REFERENCIAS

- Ashmore, S. 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. *In*: Engelmann, F (ed). International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI).
- Azurdia, C. 2006. Tres especies de zapote en América tropical (*Pouteria campechiana*, *P. sapota* y *P. viridis*). *In* Ch. Clement, J. Williams, R. Smith & N. H. Southampton (eds.). Center for Underutilised Crops, Universidad de Southampton, Southampton, UK. 216 pp.
- CATIE. 1997. Diversidad, conservación y uso sostenible de los recursos genéticos de frutales nativos de América tropical. Informe final. Cooperación Técnica IPGRI-BID.NoATN/SF-4356-R6CATIE. 23 pp.
- Gaspar, T., C. Kevers. C. Pennel, H. Greppin, D. M. Reid & T. A. Thorpe. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant* 32:272-289.
- Gazel, A., J. Morera, P. Ferreira, J. León & J. Pérez. 1999. Diversidad genética de la colección de zapote (*Pouteria sapota* (Jacquin) H. E Moore & Stearn) del CATIE. *Plant Genetic Resources Newsletter* 117: 37-42.
- George, E. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology. 2ed. Exergetics Limited. Inglaterra. 574 p.
- Henrique, J. 1973. Patrones de respiración de algunas frutas tropicales. *Proceedings of the Tropical Region American Society for Horticultural Science*. s.f. 166-175.

- Jha, S. & S. Das. 2004. Tissue culture of cashewnut. *In*: P. S. Srivastava, A. Narula & S. Srivastava (eds). Plant Biotechnology and Molecular Markers. Anamaya Publishers, New Deihi, India. 244-260.
- Jordan, M & E. Oyanedel. 1992. Regeneration of *Pouteria lucuma* (Sapotaceae) plants *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31:249-252.
- Igor, V., U. Swenson, J. Munzinger & A. Anderberg. 2005. Phylogenetic relationships among new caledonian sapotaceae (Ericales): molecular evidence for generic polyphyly and repeated dispersal. American Journal of Botany 92:667-673.
- Leifert, C., C. Morris & W. Waites. 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plants: reasons for contamination problems *in vitro*. Critical Reviews in Plant Sciences 13: 139-183.
- Leifert, C & C. Cassells. 2001. Microbial hazards in tissue and cell cultures. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 37:133.
- León, A. & L. Poveda. 2000. Los nombres comunes de las plantas de Costa Rica. *In* P. Sánchez (ed.) 1ª ed. Guayacán, San José, Costa Rica. 870 pp.
- Lobato, S. 1998. Desarrollo de métodos de propagación para la conservación y propagación de *Pouteria sapota* (Jacq). Tesis de Maestría, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza para el Desarrollo y la Conservación (CATIE). Turrialba, Costa Rica. 130 pp.
- Martínez, A., I. Allia, M, Colinas & M. Martínez. 2004. Storage of zapote mamey fruit under controlled atmosphere. Hortscience 39: 806.

- McCown, B. 2000. Special symposium: *in vitro* plant recalcitrance. Recalcitrance of woody and herbaceous perennial plant: dealing with genetic predeterminism. *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant* 36: 149-154.
- Milton, J & D. Allen. 2003. Mejoramiento genético de las cosechas. 2 ed. Editorial LIMUSA, S.A. Mexico. 511 pp.
- Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473- 497.
- Niedz, R. & M. Bausher. 2002. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 38: 468-471.
- Pennington, T. 1990. Sapotaceae. Monograph 52 flora neotrópica. New York, USA, The New York Botanical Garden. 770 pp.
- Purohit, S & A. Singhvi. 1998. Micropropagation of *Achras sapota* through enhanced axillary branching. *Scientia Horticulturae* 76:219-229.
- Purohit, S., A. Singhvi & R. Nagori. 2004a. *In vitro* shoot bud differentiation from leaf segments of *Achras sapota*. *Biologia Plantarum* 48: 109-112.
- Purohit, S. D., P. Joshi, K. Tak & R. Nagori. 2004b. Development of high efficiency micropropagation protocol of an adult tree-*Wrightia tomentosa*. In: P. S. Srivastava, A. Narula & S. Srivastava (eds). *Plant Biotechnology and Molecular Markers*. Anamaya Publishers, New Deih, India. 217-227.

- Purohit, S., S. Vyas, N. Joshi & K. Tak. 2005. *In vitro* adventitious shoot bud differentiation and plantlet regeneration in *Feronia limonia* L. (Swingle). *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant* 41: 296-302.
- Quesada, P. 1996. Inventario de la variabilidad genética del zapote (*Pouteria sapota*) en Costa Rica. *BOLTEC* 29: 48-67.
- Rathore, J. S., V. Rathore, N. S. Shekhawat, R. P. Singh, G. Liler, M. Phulwaria & H. R. Dagla. 2004. Micropropagation of woody plants. *In: P. S. Srivastava, A. Narula & S. Srivastava (eds). Plant Biotechnology and Molecular Markers. Anamaya Publishers, New Deihi, India. 183-205.*
- Roca, C. 1996. Respuesta de dos diferentes tipos de explantes de zapote (*Pouteria sapota* L. Cronquist) a diferentes medios de cultivo *in vitro*. Tesis de Maestría, Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala. 97 pp.
- Singh, M., U. Jaiswal & V. S. Jaiswal. 2004. *In vitro* regeneration and improvement in tropical fruit tree: an assessment. *In: P. S. Srivastava, A. Narula & S. Srivastava (eds). Plant Biotechnology and Molecular Markers. Anamaya Publishers, New Deihi, India. 228-243.*
- Skirvin, R. M., S. Motoike, M. A. Norton, M. Ozguran, K. Aljuboory & M. McMeans. 1999. Workshop on micropropagation. Establishment of contamination free perennial plants *in vitro*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 35: 278-280pp.
- Swenson, U. & A. Anderberg. 2005. Phylogenetic, character, evolution and classification of sapotaceae (Ericales). *Cladistic* 21:101-130.

Umaña, C. 2000. Injertación del zapote: *Pouteria sapota* (Jacquin) H. E Moore & Stearm. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Área de agricultura ecológica. Unidad de recursos fitogenéticos. Serie Técnica N° 45. 15pp.

Vázquez, J. & R. Alfonseca. 2006. Rescate de dos sapotáceas silvestres: Chicozapote, *Achras sapota* L. y Mamey, *Colocarpum mammosum* L. Universidad de Veracruz, CITRO, México. Seminario: International meeting of sapotaceae researchers National Museum of Costa Rica, San José.