



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**VARIABILIDAD GENÉTICA Y EFECTO DE
DEFICIENCIAS DE B, Cu, Fe, Mn Y Zn
EN GUAYABO (*Psidium guajava* L.)**



TESIS

DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA:

ESMERALDA CÁZARES SÁNCHEZ

Chapingo, Estado de México, abril del 2009



Instituto de Horticultura

VARIABILIDAD GENÉTICA Y EFECTO DE DEFICIENCIAS DE B, Cu, Fe, Mn y Zn
EN GUAYABO (*Psidium guajava* L.)

Tesis realizada por la M.C. Esmeralda Cázares Sánchez bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:



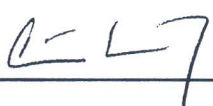
Dr. SERGIO D. SEGURA LEDESMA

ASESOR:



Dr. JOSÉ LUIS DOMÍNGUEZ ÁLVAREZ

ASESOR:



Dr. CÉSAR DEL C. LUNA MORALES

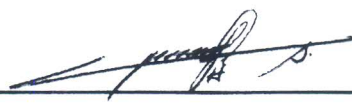
ASESOR:



Dra. REYNA I. ROJAS MARTÍNEZ

LECTOR

EXTERNO:



Dr. J. FRANCISCO SANTIAGUILLO HERNÁNDEZ

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca No. 169561 otorgada para realizar los estudios de doctorado en el Instituto de Horticultura de la Universidad Autónoma Chapingo y al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología por la beca No. 07BTD395 para conclusión de la tesis.

A la Fundación Produce, Zacatecas A. C., por el financiamiento de esta investigación.

Al comité organizador del 2º Simposio Internacional sobre guayaba y otras mirtáceas por la beca otorgada para asistir al congreso y cursos impartidos, en especial al Dr. Wolfgang Rhode, Ana R. Nuviola y Dr. Felipe Sánchez.

A los integrantes del comité asesor: Dr. Sergio D. Segura Ledesma, Dr. José Luis Domínguez Álvarez, Dr. César del C. Luna Morales, Dra. Reyna I. Rojas Martínez, M. C. Joel Pineda Pineda y Dr. J. Francisco Santiaguillo Hernández por la atención, conducción y asesoría constantes para realizar el presente trabajo de investigación.

Al coordinador del Postgrado en Horticultura Dr. J. Enrique Rodríguez Pérez y la secretaria Alejandra Varela Rojo por su constante apoyo durante mi estancia en esta institución y en el proceso de graduación.

A mis compañeros y amigos por su valiosa ayuda y respaldo en los momentos difíciles: Carlos A. Núñez, Rogelio Coatzín, Juan Ayala, Antonio Morales, Roman Flores, Manuel Mandujano, David Martínez, Dalinda Sánchez, María Luisa Arellano, Verónica Flores, Alma Rangel, Gisela Sánchez y Javier Gayosso, que tengan éxito en lo que emprendan.

DEDICATORIA

A mis padres Teresa y Rubén y hermanos Edith y Rodrigo por el apoyo incondicional que me brindaron durante este proceso.

A mi esposo Víctor Manuel Interián Ku, por haberme motivado a realizar estudios de postgrado y acompañarme en este camino.

DATOS BIOGRÁFICOS

La autora de la presente tesis M.C. Esmeralda Cázares Sánchez, es originaria de Morelia, Michoacán. Nació el 13 de enero de 1976. Es Ing. Agroindustrial egresada de la Universidad Autónoma Chapingo en 1999. Durante el 200-2001, se desempeñó como auxiliar de investigación en el proyecto “Fortalecimiento de las bases científicas de la conservación *in situ* de la biodiversidad de la milpa” en Yucatán, México en el CINVESTAV-IPN, unidad Mérida. Del 2002 al 2003 cursó la Maestra en Ciencias en el Programa de Genética en el Colegio de Postgraduados. En el 2004 trabajó como auxiliar de investigación en el laboratorio de Calidad de Maíz del Centro Experimental Valle de México del INIFAP. En el 2005 ingresó al Instituto de Horticultura de la Universidad Autónoma Chapingo para realizar estudios de Doctorado en Horticultura.

VARIABILIDAD GENÉTICA Y EFECTO DE DEFICIENCIAS DE B, Cu, Fe,
Mn y Zn EN GUAYABO (*Psidium guajava* L.)

GENETIC VARIABILITY AND DEFICIENCIES EFFECT OF B, Cu, Fe, Mn,
and Zn IN GUAVA TREE (*Psidium guajava* L.)

Esmeralda Cázares Sánchez¹, Sergio D. Segura Ledesma²

RESUMEN

En México, el guayabo (*Psidium guajava* L.) es uno de los frutales económicamente más importantes, sin embargo el conocimiento sobre su variabilidad genética y aspectos de nutrición con micronutrientes es insuficiente. Este estudio consistió en conocer su distribución actual en el país utilizando Sistemas de Información Geográfica; describir la variabilidad de una colección mediante características morfológicas y moleculares en relación a su origen y evaluar los efectos de deficiencias de micronutrientes en cuatro genotipos y

ABSTRACT

In Mexico, the guava tree (*Psidium guajava* L.) is one of the most economically important fruit crops; however, the knowledge about its genetic variability and nutritional characteristics such as micronutrients is not enough. This research consisted of determining its current distribution in the country using Geographic Information Systems, describing the variability of a collection by morphological and molecular characteristics related to its source and evaluating the deficiency effects of micronutrients in four genotypes and

¹ Tesista del Doctorado en Ciencias en Horticultura. UACH.

² Director de Tesis. Profesor investigador del Centro Regional Universitario Centro Occidente. UACH.

relacionarlos con características morfológicas y moleculares. En las zonas climatológicas potenciales para el desarrollo del guayabo se obtuvieron cuatro grupos localizados en 8 regiones florísticas con vegetación tropical en México. Esta información se puede utilizar como herramienta para delimitar las zonas de colecta de material vegetal. Se caracterizaron 49 accesiones de guayabo utilizando 40 variables morfológicas y 20 iniciadores RAPD. Los resultados sugieren una base genética estrecha, sin embargo, con los iniciadores RAPD se detectó suficiente polimorfismo (88 %) para diferenciar los genotipos con base en las huellas genéticas. El análisis de agrupamiento permitió la identificación de los grupos de acuerdo al origen geográfico y caracteres fenotípicos sobresalientes que pueden ser aprovechados en los programas de mejoramiento genético de este frutal. En el estudio de nutrición, 71 plantas de cuatro genotipos con tratamientos deficientes en B, Cu, Fe, Mn y Zn fueron caracterizadas utilizando 44 variables morfológicas y 20 iniciadores RAPD. La variación fue baja entre las plantas (0.11) y dentro de los genotipos (0.06-0.13). Los efectos de los tratamientos no fueron estadísticamente significativos, aunque se manifestaron los síntomas característicos. Se identificaron tres bandas en las huellas

relating them to morphological and molecular characteristics. In the potential climatologic regions for guava tree development, four groups were obtained and that are located in eight floristic regions with tropical vegetation in Mexico. This information can be used as a tool to determine the collecting regions of plant material. In total, 49 accessions of guava tree using 40 morphological variables and 20 RAPD primers were characterized. The results suggest a narrow genetic base; however, enough polymorphism (88 %) was detected using RAPD primers to differentiate the genotypes based on the DNA fingerprints. The cluster analysis allowed the identification of the groups according to the geographic source and outstanding phenetic characteristics that can be used in breeding programs of this fruit crop. In the nutrition study, 71 plants from four genotypes with deficient treatments of B, Cu, Fe, Mn, and Zn were characterized using 44 morphological variables and 20 RAPD primers. The variation among plants (0.11) and in the genotypes (0.06-0.13) was low. The treatment effects were not statistically significant, although the common symptoms were shown. Two bands were identified in the DNA fingerprints related to the symptoms of micronutrient deficiency: the band B1-5 related to Fe y Zn; B1-7 with Fe, Cu, B, Mn, and Zn, and the band B1-13

de ADN que se relacionan con los síntomas de deficiencias de micronutrientes: la banda B1-5 relacionada con Fe y Zn; B1-7 con Fe, Cu, B, Mn y Zn y la banda B1-13 relacionada con Fe, Mn y Zn, lo que sugiere complejidad en cuanto al número de genes que pudieran estar involucrados.

Palabras clave: Guayaba, GIS, RAPD, micronutrientes, caracterización, colecta.

related to Fe, Mn, and Zn, which suggests complexity in the number of genes that could be involved.

Key words: Guava, GIS, RAPD, micronutrients, characterization, collect.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN Y ABSTRACT.....	vi
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	xiii
 I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	 1
 II. EL GUAYABO (<i>Psidium guajava</i> L.) EN MÉXICO.....	 3
2.1 Introducción.....	3
2.2 Origen e historia del cultivo del guayabo.....	4
2.3 Nombres comunes de <i>Psidium guajava</i> L. en México.....	5
2.4 Clasificación botánica y distribución del guayabo en México.....	5
2.5 Morfología del guayabo.....	7
2.6 Biología reproductiva.....	8
2.7 Diversidad varietal.....	9
2.8 Importancia económica de la guayaba.....	11
2.9 Conservación del guayabo como recurso genético.....	14
2.9.1 Bancos de germoplasma o colecciones.....	14
2.9.2 Conservación <i>In situ</i>	15
2.10 Avances biotecnológicos.....	15
2.11 Manejo del cultivo del guayabo.....	15
2.12 Usos de productos derivados del guayabo.....	18
2.12.1 Madera.....	18
2.12.2 Corteza, hojas y raíz.....	19
2.12.3 Frutos.....	19
2.13 Instituciones con investigación y desarrollo tecnológico en guayabo.....	 20
2.14 Prioridades de investigación en guayabo y descripción del presente trabajo.....	 21
 III. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA POTENCIAL DEL GUAYABO (<i>Psidium guajava</i> L.) EN MÉXICO.....	 24
3.1 Resumen.....	24
3.2 Introducción.....	26

3.3 Materiales y métodos.....	27
3.3.1 Colección de datos.....	27
3.3.2 Análisis de datos.....	27
3.4 Resultados y discusión.....	28
3.4.1 Distribución general.....	29
3.4.2 Caracterización eco-climática.....	30
3.5 Conclusiones.....	39
 IV. ELIMINACIÓN DE COMPUESTOS OXIDATIVOS PARA INCREMENTAR LA CALIDAD Y CANTIDAD DE ADN EXTRAÍDO DE HOJAS DE GUAYABO (<i>Psidium guajava</i> L.).....	40
4.1 Resumen.....	40
4.2 Introducción.....	41
4.3 Materiales y métodos.....	43
4.3.1 Colecta y conservación de material vegetal.....	43
4.3.2 Extracción y purificación de ADN.....	43
4.3.3 Cuantificación y valoración de la calidad de ADN.....	45
4.4 Resultados y discusión.....	45
4.5 Conclusiones.....	50
 V. EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD DE TIPOS DE GUAYABO (<i>Psidium guajava</i> L.) DE INTERÉS FRUTÍCOLA DE MÉXICO MEDIANTE ANÁLISIS MORFOLÓGICO y RAPD.....	51
5.1 Resumen.....	51
5.2 Introducción.....	53
5.3 Materiales y métodos.....	57
5.3.1 Material Vegetal.....	57
5.3.2 Determinación del tamaño de muestra para la colecta de material vegetal.....	57
5.3.3 Establecimiento de la ruta de colecta.....	62
5.3.4 Colecta y conservación de material vegetal.....	63
5.3.5 Caracterización morfológica.....	67
5.3.5.1 Obtención de la información sobre caracteres morfológicos.....	67
5.3.6 Caracterización molecular.....	69
5.3.6.1 Extracción y purificación de ADN.....	69
5.3.6.2 Condiciones para PCR y obtención de patrones RAPD.....	70

5.3.7	Análisis estadístico.....	70
5.4	Resultados y discusión.....	71
5.4.1	Variabilidad genética encontrada a partir de caracteres morfológicos en las plantas de guayabo en estudio.....	71
5.4.2	Variabilidad genética encontrada en las plantas de guayabo en estudio, mediante marcadores moleculares.....	80
5.5	Conclusiones.....	90
VI. VARIABILIDAD GENÉTICA SEGÚN RAPD Y SU RELACIÓN CON DEFICIENCIAS DE MICRONUTRIMENTOS EN PLANTAS DE GUAYABO (<i>Psidium guajava</i> L.).....		
6.1	Resumen.....	91
6.2	Introducción.....	92
6.2.1	Función y síntomas de la deficiencia de los micronutrientos en estudio.....	95
6.2.1.1	Boro.....	95
6.2.1.2	Cobre.....	96
6.2.1.3	Hierro.....	96
6.2.1.4	Manganeso.....	97
6.2.1.5	Zinc.....	97
6.2.2	Características genéticas y su relación con la nutrición de las plantas.....	98
6.3	Materiales y métodos.....	101
6.3.1	Ubicación geográfica.....	101
6.3.2	Material vegetal.....	101
6.3.3	Caracterización morfológica.....	101
6.3.4	Caracterización molecular.....	102
6.3.4.1	Extracción y purificación de ADN.....	102
6.3.4.2	Condiciones para PCR y obtención de patrones RAPD.....	103
6.3.5	Inducción de deficiencias nutrimentales.....	104
6.3.6	Relación de los síntomas de deficiencias de micronutrientos con marcadores moleculares.....	107
6.3.7	Análisis estadístico.....	107
6.4	Resultados y discusión.....	109
6.4.1	Variabilidad genética encontrada en las plantas de guayabo en estudio, mediante la evaluación de características morfológicas.....	109
6.4.2	Variabilidad genética encontrada en las plantas de guayabo en estudio, con marcadores moleculares RAPD.....	115
6.4.3	Efectos de las deficiencias de B, Cu, Fe, Mn y Zn sobre el crecimiento las plantas de guayabo en estudio.....	119

6.4.4 Síntomas de las deficiencias nutrimentales en las plantas.....	131
6.4.4.1 Nitrógeno.....	131
6.4.4.2 Fósforo.....	132
6.4.4.3 Potasio.....	134
6.4.4.4 Calcio.....	135
6.4.4.5 Boro.....	136
6.4.4.6 Cobre.....	138
6.4.4.7 Hierro.....	139
6.4.4.8 Manganeso.....	141
6.4.4.9 Zinc.....	143
6.4.5 Contenidos de nutrimentos en muestras de tejido vegetal.....	145
6.4.6 Relación de los síntomas de deficiencias de micronutrientes con marcadores moleculares.....	147
6.4.6.1 Con base en los grupos de los dendrogramas general y por tipo.....	147
6.4.6.2 Mediante el análisis de correspondencia.....	153
6.4.6.3 Con los grupos formados por tratamiento.....	154
6.5 Conclusiones.....	157
VII. DISCUSIÓN GENERAL.....	158
7.1 Estructuración de la variación genética y ecogeográfica del guayabo en México.....	159
7.2 Variación genética y deficiencias de micronutrientes.....	164
7.3 Perspectivas para la conservación y utilización del guayabo en México.....	170
VIII. CONCLUSIONES GENERALES.....	173
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	176
X. ANEXOS.....	191

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
II. EL GUAYABO (<i>Psidium guajava</i> L.) EN MÉXICO	
Cuadro 1. Especies de <i>Psidium</i> con registros de herbario colectadas en México.....	6
Cuadro 2. Variedades derivadas del mejoramiento genético de <i>P. guajava</i> L. en diferentes países.....	10
Cuadro 3. Producción de guayaba en México total por estados del año 2007.....	12
Cuadro 4. Registros de la producción de guayaba en México de 1998 al 2007.....	13
Cuadro 5. Registros de la producción de los frutales más importantes de México.....	13
Cuadro 6. Contenido nutricional de la guayaba en 100g de porción comestible.....	19
Cuadro 7. Instituciones y líneas de investigación enfocadas al cultivo del guayabo.....	20
Cuadro 8. Instituciones y nivel de colaboración en el presente trabajo de investigación.....	23
Figura 1. Producción de <i>P. guajava</i> L. en el mundo.....	14
III. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA POTENCIAL DEL GUAYABO (<i>Psidium guajava</i> L.) EN MÉXICO	
Cuadro 1. Sitios de colecta de las muestras botánicas de <i>Psidium guajava</i> L.	29
Figura 1. Distribución probable de <i>Psidium guajava</i> L. en México.....	30
Figura 2. Dendrograma de las colecciones de <i>Psidium guajava</i> L. resguardadas en los herbarios analizados.....	30
Figura 3. Distribución probable de <i>Psidium guajava</i> L. en México, para los individuos del grupo I.....	31
Figura 4. Distribución probable de <i>Psidium guajava</i> L. en México, para los individuos del grupo II.....	32
Figura 5. Distribución probable de <i>Psidium guajava</i> L. en México, para los individuos del grupo III.....	33
Figura 6. Distribución probable de <i>Psidium guajava</i> L. en México, para los individuos del grupo IV.....	34

Figura 7.	Condiciones de temperatura y precipitación pluvial características de los ambientes probables para el desarrollo de <i>P. guajava</i> L. en México.....	35
-----------	---	----

IV. ELIMINACIÓN DE COMPUESTOS OXIDATIVOS PARA INCREMENTAR LA CALIDAD Y CANTIDAD DE ADN EXTRAÍDO DE HOJAS DE GUAYABO

(*Psidium guajava* L.)

Figura 1.	Cambio de coloración por procesos de oxidación de las muestras de ADN extraídas.....	46
Figura 2.	Gel de calidad del ADN de las muestras más problemáticas....	47
Figura 3.	Gel de calidad del ADN de muestras problemáticas en una segunda prueba de extracción.....	47
Figura 4.	Patrones de bandeo de ADN extraído a partir de tejido fresco de hojas de guayabo.....	48
Figura 5.	Patrones de bandeo de ADN extraído a partir de tejido seco de hojas de guayabo.....	48

V. EVALUACION DE LA VARIABILIDAD DE TIPOS DE GUAYABO

(*Psidium guajava* L.) DE INTERÉS FRUTÍCOLA DE MÉXICO MEDIANTE ANÁLISIS MORFOLÓGICO y RAPD

Cuadro 1.	Procedencia de los genotipos de guayabo colectados en las provincias florísticas sierra madre oriental, serranías meridionales y costa del golfo de México.....	58
Cuadro 2.	Valores de probabilidad de encontrar <i>Psidium guajava</i> L., en 109 municipios donde se desarrolla vegetación tropical en México.....	59
Cuadro 3.	Número y porcentaje de colectas por tipo de vegetación.....	62
Cuadro 4.	Regiones, estados y número de municipios con probabilidad de encontrar guayabo y con reportes de colectas de herbario.....	63
Cuadro 5.	Procedencia de los genotipos de guayabo colectados en las provincias florísticas costa del golfo de México, serranías transísmicas y península de Yucatán.....	64
Cuadro 6.	Origen de los genotipos de guayabo de la colección de germoplasma ubicada en Tabasco, Zacatecas.....	66
Cuadro 7.	Caracteres cualitativos evaluados en árbol, brote, hoja y fruto de guayabo.....	67
Cuadro 8.	Caracteres cuantitativos medidos en hoja, pecíolos y fruto.....	68
Cuadro 9.	Características cualitativas evaluadas en tallo, rama, brote y	

	hoja.....	73
Cuadro 10.	Características cualitativas evaluadas en fruto.....	74
Cuadro 11.	Valores de las características evaluadas en hoja de las plantas por grupo.....	74
Cuadro 12.	Valores de las características evaluadas en fruto y semillas por grupo.....	75
Cuadro 13.	Características de los oligonucleótidos utilizados para la obtención de los patrones de bandeo y polimorfismo encontrado.....	81
Cuadro 14.	Valores mayores de las estadísticas de variación genética de los loci detectados en 49 individuos de guayabo.....	86
Cuadro 15.	Alelos que no están en equilibrio por iniciador.....	87
Figura 1.	Imágenes digitalizadas de hojas, pecíolos y tallos de guayabo de donde se obtuvieron los datos cuantitativos.....	68
Figura 2.	Número de grupos en el dendrograma en función de las pseudoestadísticas F y T ²	72
Figura 3.	Diagrama de agrupamiento jerárquico de los genotipos en estudio con base en características morfológicas cualitativas y cuantitativas.....	72
Figura 4.	Representación gráfica de las dos primeras Funciones Discriminantes Canónicas.....	77
Figura 5.	Polimorfismos observados con los patrones de bandeo de RAPD en las plantas de guayabo en estudio.....	80
Figura 6.	Agrupamiento de las 49 plantas de guayabo en función de los marcadores RAPD.....	84
Figura 7.	Valores medios y desviación estándar del número de alelos observados y efectivos e índices de diversidad por grupo.....	85
Figura 8.	Dendrograma con base en la distancia genética de Nei y el método UPGMA.....	87

VI. VARIABILIDAD GENÉTICA SEGÚN RAPD Y SU RELACIÓN CON DEFICIENCIAS DE MICRONUTRIMENTOS EN PLANTAS DE GUAYABO (*Psidium guajava* L)

Cuadro 1.	Elementos esenciales en las plantas, formas de absorción y concentraciones consideradas adecuadas.....	93
Cuadro 2.	Compuestos utilizados para elaborar la solución nutritiva de Hogland y Arnon.....	94
Cuadro 3.	Procedencia y características del material vegetal evaluado.....	101
Cuadro 4.	Caracteres cualitativos evaluados en árbol, brote y hoja.....	102
Cuadro 5.	Caracteres cuantitativos medidos en hoja.....	102

Cuadro 6.	Solución nutritiva utilizada para inducir deficiencias de micronutrientes en las plantas de guayabo.....	104
Cuadro 7.	Síntomas visuales para diagnosticar deficiencias nutricionales en plantas.....	105
Cuadro 8.	Características cuantitativas medidas en la planta.....	106
Cuadro 9.	Características cualitativas evaluadas en tallo, rama, brote y hoja.....	110
Cuadro 10.	Valores de las características cuantitativas evaluadas en hoja por grupo.....	111
Cuadro 11.	Valores de las características cuantitativas de la planta por grupo.....	112
Cuadro 12.	Características de los oligonucleótidos utilizados para la obtención de los patrones de bandeo y polimorfismo encontrado por genotipo.....	115
Cuadro 13.	Valores significativos ($P \leq 0.05$) del análisis de χ^2 de los loci encontrados en cuatro poblaciones de guayabo.....	118
Cuadro 14.	Cuadrados medios del análisis de varianza del efecto de los tratamientos sobre características físicas de hojas y tallos.....	119
Cuadro 15.	Cuadrados medios del análisis de varianza del efecto de los tratamientos sobre características físicas de raíz y ápices radicales.....	120
Cuadro 16.	Cuadrados medios del análisis de varianza del efecto de los tratamientos sobre características físicas de la planta completa, tallo y rama.....	120
Cuadro 17.	Comparación de promedios de características físicas evaluadas en hojas, tallo y rama por tipo.....	122
Cuadro 18.	Comparación de promedios de los incrementos en altura, diámetro de tallo y rama e índices de biomasa evaluados por tipo.....	122
Cuadro 19.	Comparación de promedios de características físicas evaluadas en raíz por tipo.....	122
Cuadro 20.	Comparación de promedios de características físicas evaluadas en hojas, tallo y rama por tratamiento.....	124
Cuadro 21.	Comparación de promedios de los incrementos en altura, diámetro de tallo y rama e índices de biomasa evaluados por tratamiento.....	124
Cuadro 22.	Comparación de promedios de características físicas evaluadas en raíz por tratamiento.....	125
Cuadro 23.	Valores propios de las Funciones Discriminantes Canónicas de los tratamientos evaluados.....	126

Cuadro 24.	Valores de probabilidad de los diferentes estadísticos obtenidos mediante al Análisis Discriminante Canónico de los tratamientos evaluados.....	128
Cuadro 25.	Contenido promedio de los elementos analizados en las plantas por tratamiento.....	145
Cuadro 26.	Límites del contenido de nutrientes en las hojas de guayabo.....	146
Cuadro 27.	Bandas comunes entre las plantas en estudio por cada tratamiento.....	155
Figura 1.	Número de grupos en función de las pseudoestadísticas F y T ² .	109
Figura 2.	Diagrama de agrupamiento jerárquico de las 72 plantas por su morfología.....	110
Figura 3.	Representación gráfica de las dos primeras Funciones Discriminantes Canónicas.....	114
Figura 4.	Patrones de bandeo de RAPD en plantas de guayabo Media China (1-18), Sassaoka (19-36) y San Cristóbal (37-42) con el iniciador OPB17.....	116
Figura 5.	Valores medios y desviación estándar del número de alelos observados y efectivos por población.....	117
Figura 6.	Dendrograma con base en la distancia genética de Nei y el método UPGMA, para cuatro tipos de guayabo.....	118
Figura 7.	Representación gráfica de las dos primeras Funciones Discriminantes Canónicas de los tratamientos evaluados.....	127
Figura 8.	Representación gráfica de las tres primeras Funciones Discriminantes Canónicas de los tratamientos evaluados.....	128
Figura 9.	Deficiencia de Nitrógeno en las plantas de guayabo.....	131
Figura 10.	Deficiencia de Fósforo en las plantas de guayabo en estudio...	133
Figura 11.	Deficiencia de potasio en plantas de guayabo inducidas a deficiencias de a) Cobre; b) Boro; c) Manganeso y d) Testigo....	134
Figura 12.	Deficiencia de calcio en plantas de guayabo inducidas a deficiencias de a) y b) Boro; c) y d) Manganeso; e) y el tratamiento testigo.....	135
Figura 13.	Deficiencia de boro en las plantas de guayabo en estudio: a) nervaduras y tallos y b) entrenudos en tratamiento Testigo c) hojas y d) ápices radicales.....	137
Figura 14.	Deficiencia de cobre en las plantas de guayabo en estudio: a) inducidas a deficiencia de Manganeso y b) Hierro; c) hojas, d) entrenudos, e) brotes y f) ápices radicales.....	138
Figura 15.	Deficiencia de hierro en las plantas de guayabo en estudio: a) deficientes en Cobre y b) deficientes en Boro c) hojas y d) ápices radicales.....	140

	estudio: a) hojas y b) ápices radicales.....	142
Figura 17.	Deficiencia de zinc en las plantas de guayabo en estudio: a) entrenudos, b) y c) hojas, d) tallos y e) ápices radicales.....	144
Figura 18.	Agrupamiento de las 71 plantas de guayabo en función de los marcadores RAPD.....	148
Figura 19.	Agrupamiento jerárquico de las 18 plantas del tipo Media China.....	149
Figura 20.	Agrupamiento jerárquico de las 18 plantas del tipo Sassaoka.....	150
Figura 21.	Agrupamiento jerárquico de las 18 plantas del tipo San Cristóbal.....	151
Figura 22.	Agrupamiento jerárquico de las 18 plantas del tipo Oaxaca.....	152

ANEXOS

Anexo 1.	Valores de las características evaluadas en hoja de las plantas por accesión.....	191
Anexo 2.	Valores de las características evaluadas en fruto y semillas de las plantas por accesión.....	192
Anexo 3.	Estructura Canónica Total de las características morfológicas, de las 42 accesiones, en las dos Funciones Discriminantes.....	194
Anexo 4.	Calibres establecidos en la norma Codex Stan 215-1999 para la guayaba.....	194
Anexo 5.	Estructura Canónica Total de las características morfológicas, de las 72 plantas, en las dos Funciones Discriminantes.....	195
Anexo 6.	Estructura Canónica Total de las características morfológicas cuantitativas evaluadas en el experimento de nutrición, en las tres Funciones Discriminantes.....	196
Anexo 7.	Relación de bandas con las deficiencias de micronutrientes por tipo con base en el análisis de correspondencia.....	197

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El guayabo (*Psidium guajava* L.) es un frutal que pertenece a la familia Myrtaceae, nativo de América tropical y de gran importancia en todas las áreas tropicales del mundo (Bourke, 1976; Ferrão, 1992).

En México, a diferencia de países que cuentan con variedades mejoradas, la producción proviene de materiales locales (Manica, 2000; González *et al.*, 2002). No obstante, dada la variabilidad de guayabo existente en nuestro país, es posible que con la recolección y evaluación de genotipos sobresalientes y mediante mejoramiento genético, se obtengan variedades con las características requeridas por la industria o para el consumo en fresco. Esta tarea se puede apoyar con los sistemas de información geográfica que se han convertido en una herramienta eficaz para la ubicación de las zonas eco-climáticas donde se desarrollan los recursos fitogenéticos y para identificar zonas con características apropiadas para el cultivo de especies de importancia económica (Jones *et al.*, 2002; Sánchez-Cordero y Martínez-Meyer, 2000).

Otro de los factores importantes a estudiar relacionados con la producción comercial de la guayaba en México, son los efectos de las deficiencias nutrimentales sobre la planta y el papel que juega la variabilidad genética presente en los huertos en relación a la susceptibilidad o tolerancia de estas, ya que constituyen una limitante para su cultivo. Llama la atención que aún en las plantaciones importantes el manejo del cultivo, en general, es principalmente empírico (González *et al.*, 2002).

La presente investigación se llevó a cabo en un marco de colaboración entre el Instituto de Horticultura, el Sistema de Centros Regionales de la Universidad Autónoma Chapingo y el Instituto de Fitopatología del Colegio de Postgraduados. Consistió en describir la variabilidad de colecciones de guayabo por medio de información ecorregional, morfológica y molecular así como, respecto al manejo agronómico, evaluar el efecto de deficiencias nutrimentales y su asociación con marcadores moleculares. Con los resultados obtenidos, se contribuye a una mejor comprensión de la distribución potencial y la estructuración de la variabilidad de la especie y su relación con las deficiencias nutrimentales, con el fin de asegurar su conservación y una mejor utilización de este recurso genético por los programas de investigación mexicanos, en beneficio de quienes dependen económicamente de la producción de guayaba en el país.

II. EL GUAYABO (*Psidium guajava* L.) EN MÉXICO

2.1 Introducción

El guayabo (*Psidium guajava* L.) es una especie frutal originaria de las regiones de América tropical (Bourke, 1976; Moncur, 1988). Pertenece a la familia Myrtaceae, cuyos caracteres distintivos son las hojas coriáceas, aromáticas y opuestas, ovario inferior, flores con numerosos estambres, fruto con lóculos y semillas sin o con muy poco endospermo (Rodríguez y Porras, 2002; Hutchinson, 1979). Dentro de los principales géneros de esta familia se encuentran *Eugenia*, *Syzygium*, *Psidium*, *Myrciaria* y *Feijoa* entre otros (León, 1987).

Según los escritos de Hernández Oviedo fue conocida por los europeos por primera vez en 1526 (Bourke, 1976; Méndez, 1995). Actualmente, después de Brasil, nuestro país es el segundo productor de guayaba en el mundo (Mitra *et al.*, 2008) y cuenta con regiones donde se desarrollan diferentes tipos de vegetación tropical, bajo condiciones ambientales y fisiográficas específicas, que en total ocupan alrededor del 25 % de su superficie, en las que posiblemente se puedan encontrar variedades locales de *P. guajava* cultivadas, fomentadas o toleradas en solares, huertos familiares o potreros así como materiales silvestres principalmente en los caminos.

La generación de conocimientos sobre el manejo y mejoramiento genético de este frutal, es una tarea que se ha centrado en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Universidad Autónoma Chapingo y Colegio de Postgraduados, principalmente, a través de diferentes

líneas de investigación en coordinación con programas de gobierno y mediante la vinculación directa con grupos de productores. En general, destaca el interés por la conservación y aprovechamiento de este recurso fitogenético para la generación de variedades y paquetes tecnológicos adecuados, que contribuyan a mejorar los ingresos económicos de quienes dependen de esta actividad en el país.

2.2 Origen e historia del cultivo del guayabo

Respecto al lugar de origen del guayabo se señala la costa de Perú, por vestigios encontrados que indican que el guayabo se cultivaba junto con maíz, papa, pepino, aguacate, frijol, chile, calabaza, guanábana y algodón entre otros, además de considerarse como uno de los centros de desarrollo de la agricultura que mantuvo contacto con centro América (Ugent *et al.*, 1986; Harris, 1967). No obstante, Pickersgill (1969), sugiere con base en estudios taxonómicos y arqueológicos, que el guayabo no se encontraba silvestre en la costa de Perú y que fue introducido a este lugar de las laderas del este de los Andes. En México, en las investigaciones realizadas por MacNeish en las cuevas del valle de Tehuacán, Puebla, se encontraron vestigios de guayaba que fueron fechados en 700 D. C. (Harris, 1967).

Antes de la llegada de los españoles el guayabo se encontraba ampliamente difundido entre los diferentes grupos étnicos del continente americano quienes lo utilizaron, en ocasiones, como ofrenda de paz para los conquistadores (Guzzy, 1986). El nombre de guayaba proviene de las antillas y se describe como una fruta de sabor agridulce de la que ya se distinguían variedades de pulpa rosa y blanca, así como los tipos silvestres de los domesticados que eran cultivados. A mediados del siglo XVI los españoles utilizaban la fruta por sus propiedades astringentes así como la madera por su elasticidad y resistencia. Los portugueses probablemente la llevaron a África y Oriente, donde fue rápida

y fácilmente difundida gracias a su gran rusticidad. Para 1590, la guayaba había logrado penetrar en la India y se servía como fruta en la mesa del emperador (Méndez, 1995).

Algunos autores sugieren que los pájaros y animales domésticos jugaron un papel importante en el proceso de dispersión, principalmente en campos abiertos y pastizales, debido a que al pasar las semillas por el tracto digestivo se incrementa su poder germinativo, a tal magnitud, que en 1568 en la Isla de Santo Domingo, se consideró como la principal causa de la escasez de carne lo que motivó a su erradicación a finales del siglo XVIII (Méndez, 1995; Patiño, 1963).

2.3 Nombres comunes de *Psidium guajava* L. en México

Para *Psidium guajava* L. en México, el nombre genérico del fruto es “guayaba” y del árbol “guayabo”; no obstante, se han documentado los nombres comúnmente utilizados por los grupos étnicos establecidos en el área de distribución natural de la especie: Pichi, Maya, Yucatán; Posh, Mixe, Oaxaca; Enandí, Tarasco, Michoacán; Bec, Huasteco, San Luis Potosí; Chalhócotl, Náhuatl; Al-pil-ca, Chontal, Oaxaca; Yaga-huii, Bjui, Pehui; Zapoteco, Oaxaca A’sihui’t, Totonaco, Puebla; Ca’aru, Cora, Nayarit; Mo’eyi, mo’i, Cuicateco, Guerrero; Xoxococuáhuatl, Morelos; Ñi-joh, Chinanteco, Oaxaca; Pata, Tzeltal, Chiapas; Pojosh, Popoluca, Veracruz; Pocs-cuy, Sambadán, Zoque, Chiapas; Posh-keip, Mixe, Oaxaca; Vayeva-vaxi-te, Huichol, Jalisco; Gua-ibasim, Mayo, Sonora (Pennington y Sarukhan, 2005).

2.4 Clasificación botánica y distribución del guayabo en México

El guayabo está clasificado dentro del Reino *Plantae*, División *Magnoliophyta*, Clase *Magnoliopsida*, Orden *Myrtaceae*, Género *Psidium*, Especie *guajava*. Cabe destacar que la familia *Myrtaceae* está formada por alrededor de 130 géneros y

cerca de 4000 especies distribuidas en los trópicos y subtrópicos de América, Asia y Australia (Kenneth *et al.*, 2004). La vegetación representativa va desde árboles altos, arbustos hasta lianas. Muchas de estas especies son cultivadas como ornamentales, para la extracción de aceites esenciales, gomas, taninos, resinas, frutos, para la explotación de productos maderables y como especias (clavo, nuez moscada y la canela). En particular el género *Psidium* incluye cerca de 150 especies que se distribuyen en las regiones tropicales y subtropicales del continente americano de donde se infiere su origen más probable (Nakasone y Paull, 1998). En México las especies de mayor importancia debido a su distribución son *P. guajava*, *P. sartorianum* y *P. guineense*, aunque también se tienen registros de *P. friedrichsthalianum*, *P. salutare*, *P. hypoglaucum* y *P. galapageium* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Especies de *Psidium* con registros de herbario colectadas en México.

Especie	No. de registros	Estados de colecta
<i>P. guajava</i>	1148	Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Colima, Durango, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tabasco, Veracruz, Yucatán
<i>P. sartorianum</i>	244	La Paz B.C.S., Campeche, Chiapas, Colima, Durango, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Querétaro, Quintanarro, Sinaloa, Tlaxcala, Veracruz, Yucatán.
<i>P. guineense</i>	83	Chiapas, Oaxaca, Guerrero Tabasco, Veracruz, Quintanarro, San Luis Potosí, Jalisco, Nayarit, Sinaloa.
<i>P. friedrichsthalianum</i>	9	Chiapas, Oaxaca y Veracruz
<i>P. salutare</i>	7	Guerrero, Michoacán, Veracruz, Chiapas
<i>P. hypoglaucum</i>	3	Campeche, Chiapas, Oaxaca
<i>P. galapageium</i>	1	Isla Socorro, Colima

Fuente: CONABIO, 2005.

México cuenta con superficies de vegetación tropical con ambientes propios para el desarrollo de *P. guajava*. Rzedowski (1978), las clasificó como Bosque

tropical perennifolio, subcaducifolio, caducifolio y mesófilo de montaña. Se desarrollan entre los 0 y 1900 m.s.n.m., con 1000 a 3000 mm de precipitación al año; períodos de sequía que van de 4 a 7 meses excepto para el perennifolio y temperaturas medias anuales entre los 12 y los 29 °C. Presentan climas Am y Af (más húmedos), Cw y Cf (frescos), Aw (menos húmedos) y Bs (seco). Su distribución geográfica abarca partes de los estados de Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Chihuahua, Tamaulipas, Veracruz, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo, Puebla, Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas. Además de estas zonas tropicales, se ha observado que el guayabo también se desarrolla en zonas templadas del país o con mayor altura y menor humedad, lo que se ha aprovechado para el establecimiento de huertos comerciales para su cultivo.

2.5 Morfología del guayabo

Árbol o arbusto hasta de 10 m y 60 cm de diámetro a la altura del pecho, tronco generalmente torcido, ramas gruesas, ascendentes, retorcidas y copa irregular. La corteza es escamosa en piezas lisas, delgadas e irregulares, pardo rojizas, con escamas grisáceas. Internamente va del color crema rosado a pardo oscuro, es fibrosa, amarga y con un grosor de 5 a 8 mm. En la madera, la albura va del color crema amarillento a rosado. Las ramas jóvenes son cuadrangulares al seccionarse y densamente pubescentes y en las partes más viejas son escamosas y glabras, pardo verdosas a moreno verdosas, sin lenticelas. Las yemas de las hojas van de 5 a 15 mm de largo, desnudas, endebles, grises o blancuzcas, densamente pubescentes. Dos estípulas, filiformes de 0.5 a 1 mm de largo, caedizas. Hojas coriáceas y aromáticas, decusadas, simples, con láminas de 3 x 1.5 a 13.5 x 6 cm, oblanceoladas, oblongas o elípticas, con el margen entero, ápice agudo a redondeado, base aguda a truncada, de color verde brillante a verde parduzco, opacas y finamente pubescentes a glabras en el haz y gris verdosas a gris parduzcas, densamente pubescentes en el envés; abundantes

puntos glandulosos transparentes en la lámina; hojas fragantes cuando se estrujan, nervación amarillenta y prominente en el envés; pecíolos de 2 a 5 mm pubescentes. Las flores son solitarias en cimas hasta de 8 cm, axilares con pedúnculos de 1.5 a 3 cm de largo, pubescentes, dulcemente perfumadas, actinomorfas. Tienen de 4 a 5 pétalos blancos de 1.5 a 2 cm de largo, obovados o elípticos con el ápice redondeado, pubescentes en la superficie exterior, estambres numerosos de 1.5 a 2 cm de largo, filamentos blancos y anteras cremas, ovario ínfero, 5-locular, lóculos multiovulares; estilo robusto de 1 a 1.5 cm de largo, de color crema verdoso, glabro, estigma pequeño, truncado. El cáliz tiene de 3 a 5 sépalos de 1 cm de largo, ovados, reflejos, pubescentes en ambas superficies, verdes en el exterior y blancos en el interior. Los Frutos son comestibles, bayas hasta de 8 cm de diámetro, globosas a ovoides, con el cáliz persistente, carnosas, de color crema amarillento a rosado, de olor fragante y sabor agridulce, conteniendo abundantes semillas de 3 a 5 mm, rodeadas de una pulpa amarillenta de sabor muy agradable (Pennington y Sarukhan, 2005; León, 1987; Moncur, 1988; Chandler, 1962).

2.6 Biología reproductiva

Los guayabos conducidos a pie franco o de semilla comienzan a florecer a los dos o tres años de edad, de marzo a septiembre y de 4 a 5 meses después, se obtienen frutos maduros. Florecen y fructifican año con año pero pueden entrar en dormancia en regiones frías. Si la disponibilidad de agua es limitada, la temporada cálida y húmeda reúne las condiciones para promover la floración. A un periodo de intensa floración normalmente sigue un descanso que por lo general coincide con un periodo seco o frío (Moncur, 1988; González *et al.* 2002).

En las axilas de las hojas de nueva formación, crecen de dos a tres cimas de flores, y rara vez se forman en los extremos terminales. El meristemo apical es inicialmente pequeño y se ubica entre el primordio de la hoja y los tricomas. Los

sépalos inician como un anillo continuo de tejido y posteriormente desarrollan una cápsula cónica invertida encima de los órganos florales. Enseguida se forman los cinco pétalos seguidos del pistilo en una pequeña depresión en el centro. Aparecen los estambres como pequeñas bombas sobre los lados de la depresión. El estilo se elonga y el estigma se diferencia en cuatro lóbulos. A continuación los estambres se diferencian y se forman las anteras y filamentos. En esta etapa el botón floral está cubierto por dos bracteolos y mide alrededor de 5 mm de longitud. Al tomar una forma cónica y definirse la pared se desarrolla el pedúnculo. El ovario se desarrolla en una cavidad separada en la base del estilo con numerosos óvulos en formación. Con un crecimiento continuo el estigma desarrolla bulbos y protuberancias encima de las anteras. Posteriormente, se abre la flor con el estigma elongado, pétalos bien formados y numerosos estambres libres. Cuando las flores abren, se libera el polen de las anteras de la periferia hacia las del centro durante varias horas. El estigma está receptivo justo antes de que la flor abra y se libere el polen y puede durar de dos a tres días. Los pétalos caen alrededor de dos días después de la antesis pero los lóbulos del cáliz pueden persistir. Las flores fragantes con abundante polen y néctar son atractivas para insectos voladores, especialmente para las abejas, que son un vector importante para transportar el polen, permitir la autopolinización o la polinización cruzada en otro lugar. En general, se estima que la polinización cruzada se ubica entre el 25 y 41 %, con una media de 36 %. La autopolinización en árboles aislados ha sido registrada entre el 64 y 90 % (Moncur, 1988).

2.7 Diversidad varietal

El desarrollo de cultivares de guayabo con características superiores en el mundo (Cuadro 2), se dio a mediados del siglo XX. En 1941, en Florida se describió el primer cultivar; en 1957 en Nuevo Gales del Sur ya se desarrollaban programas de mejoramiento genético; en Puerto Rico para 1963 tenían alrededor de 100 selecciones en observación; entre 1948 y 1969 se introdujeron a Hawaii 21

cultivares de 7 países diferentes para su evaluación. En 1975 en California, la India, Egipto y Colombia ya existían cultivares con características específicas para su consumo (Morton, 1987). De manera general, en el mejoramiento genético del guayabo se han utilizado métodos convencionales tales como la selección, hibridación intervarietal, hibridación interespecífica, autopoliploidia, aneuploidia y mutación (Negi y Rajan, 2007).

Cuadro 2. Variedades derivadas del mejoramiento genético de *P. guajava* L. en diferentes países.

País	Cultivares	Destino
Florida E.U.	Blitch, Ruby, Red Indian, Redlan, Ruby, Supreme, Patillo, Miami Red	En fresco, jaleas, almíbar, enlatados
Hawai E.U.	Beaumont, Ka Hua Kula, Waiakea, Hong K.	En fresco, puré y otros
California E.U.	Webber, Rolfs, Hart	En fresco, industria
India	Apple Colour, Behat Coconut, Chittidar, Habshi, Lucknow 49, Safeda, Smooth Green, Allahabad, Nagpur Seedless, Anakapalle, Red-fleshed, Banaras, Kaffree, Dholka	En fresco, enlatados, jaleas
Tailandia	Donrom, Glom Toon Klau, Thai Maroon	En fresco
Egipto	Bassateen E1 Sabahia, Bassateen Edfina	En fresco
Puerto Rico	Corazal mixta, Corriente, Seedling 57-6-79	En fresco
Indonesia	Indonesian Sedles, Kampuchea	En fresco, jugos, enlatados
Trinidad y Tobago	Cayene, Centeno Pacífico, Elizabeth, Stone	En fresco, jugos, néctares, jaleas, pastas
Colombia	Puerto Rico, Rojo Africano, Agrio, Palmira	En fresco, industria
Brasil	Pera Vermelha, Selección Roja de Florida	En fresco, industria
México	No existen cultivares bien caracterizados: Media China y China, Selecciones en evaluación	En fresco, dulces regionales como ates, mermelada o almíbar, concentrados, jugos y néctares

Fuente: Morton (1987); González *et al.* (2002).

En México, a pesar de que se reportan trabajos desde la década de los sesentas, aún no se registran cultivares bien caracterizados que presenten ventajas comparativas tanto para el consumo en fresco, la industria o con doble

propósito. Un ejemplo de ello es que desde hace más de 100 años en la región “Calvillo-Cañones”, el germoplasma de guayabo que se cultiva es conocido genéricamente como “Media China” y “China” (González *et al.*, 2002). No obstante, el país cuenta con aproximadamente la cuarta parte de su superficie con ambientes propios para el desarrollo de vegetación tropical, en donde es probable encontrar una variedad de materiales de *P. guajava* L. con características sobresalientes para su cultivo aún sin evaluar y que podrían formar parte de los diferentes programas de mejoramiento que se llevan a cabo en la actualidad de este frutal.

2.8 Importancia económica de la guayaba

Con una producción promedio de 11.7 t.ha⁻¹, la guayaba se cultiva en 22 estados de la República. El mayor número de municipios con este cultivo se observa en Michoacán, Jalisco, Guerrero y el Estado de México, pero las entidades de mayor importancia por superficie sembrada y volumen de producción son Michoacán, Aguascalientes y Zacatecas. El máximo rendimiento lo registra el estado de Colima y el mínimo Baja California Sur (18.3 y 1.3 t.ha⁻¹, respectivamente); Tabasco y Michoacán se ubican dos puntos y medio arriba de la media nacional, Aguascalientes está cercano a la media y Zacatecas dos puntos abajo de esta (Cuadro 3).

En los últimos 10 años en México se observa la tendencia a incrementar tanto la superficie sembrada total como la cosechada y la producción, no obstante resaltan las fluctuaciones del precio medio rural por tonelada entre 2,600 y 4,300 pesos que no necesariamente coinciden con la tendencia anterior, pero que una vez multiplicado por la producción total se mantiene (Cuadro 4).

Cuadro 3. Producción de guayaba en México total por estados del año 2007.

Estado	Municipios	Superficie sembrada ha	Producción t	Rendimiento t.ha ⁻¹
Michoacán	Apatzingán, Ario, Arteaga, Buenavista, Chilchota, Cuitzeo, Gabriel Zamora, Hidalgo, La Huacana, Irimbo, Jacona, Madero, Maravatío, Mújica, Nuevo Urecho, Parácuaro, Peribán, Los Reyes, Salvador Escalante, Santa Ana Maya, Susupuato, Tacámbaro, Taretan, Tocumbo, Turicato, Tuxpan, Tuzantla, Tzitzio, Uruapan, Villamar, Zinapécuaro, Ziracuaretiro, Zitácuaro, Juárez, Jungapeo.	9,297	129,196	14.03
Aguascalientes	Calvillo	6,862	71,010	11.37
Zacatecas	Huanusco, Juchipila, Mezquital del Oro, Moyahua de Estrada, Nochistlán de Mejía, Villanueva, Tabasco, Apozol, Jalapa	4,843	43,069	8.89
Estado de México	Almoloya de Alquisiras, Amatepec, Ixtapan de la sal, Ixtapan del Oro, Luvianos, Malinalco, Oculan, Oztoloapan, Santo Tomás, Tonatico, Valle de Bravo, Villa Guerrero, Zacazonapan, Temascaltepec, Zumpahuacan, Coatepec Harinas	877	11,095	12.65
Jalisco	Alengo, Autlán de Navarro, La Barca, Bolaños, Cabo comales, Chapala, Colotlan, Gómez Farías, Huejuquilla el alto, Ixtlahuacan de los membrillos, Mazamitla, Mezquitic, San Cristóbal de la Barranca, Tala, Tizapan el Alto, Tlajomulco de Zúñiga, Totatiche, Tuxueca, Villa Guerrero, Yahulica de González Gallo, Zapopan, Zapotitlán de Vallido, Mascota, Talpa de Allenede, San Gabriel	484	4,102	9.68
Guerrero	Arcelia, Buenavista de Cuellar, Cutzamala de Pinzón, Eduardo Neri, Iguala de la Independencia, Iguala, Ixcateopan de Cuauhtémoc, Ometepec, Pedro Ascencio Alquisiras, Pilcaya, San Luis Alcatlan, Taxco de Alarcón, Tetipac	303	3,740	12.53
Guanajuato	Cueramaro, Salamanca, Tarandacua, Guanajuato, Huanimaro, Pénjamo, Silao, Jerécuaro, Salvatierra, Yuriria, Abasolo	201	1,208	6.01
Durango	Pueblo Nuevo, San Dimas, Canelas, Tamazula	186	434	2.34
Nayarit	Amatan de Cañas, Ruiz, Ahuacatlán, Ixtlán del Río, Bahía de Banderas, San Pedro Lagunillas, Santa María del Oro.	99	742	7.51
Chiapas	Chiapa de Corzo	95.0	484	5.09
Querétaro	Arroyo Seco, Peñamiller, Jalpan de Serra, Toliman	85	431	5.07
Hidalgo	Mezquititlán, Molango, Tocoautla, Zimapan	77	323	4.24
Tabasco	Centro	45	661	14.69
Colima	Colima, Comala, Cuauhtémoc	41	754	18.39
Veracruz	Nautla, Altotonga, Martínez de la Torre, Alzalan	33	285	8.69
Morelos	Amacuzac, Tlayacapan, Yautepec, Yecapixtla, Temixco, Tlatizapan, Miacatlan, Cuernavaca	29	114	4.36
Puebla	Epatlan	21.0	168	8.0
Baja California S.	Mulegé, La Paz, Los Cabos, Comondú	17	21	1.33
Oaxaca	Putla de Guerrero, Santa María Zacatepec	4	11	2.86
Yucatán	Peto, Tadhziu, Tzucacab	7	27	3.86

Baja California N.	Ensenada	2.0	0	0
Media Nacional				11.73
TOTAL		23,621	267,912	

Fuente: SAGARPA, 2007.

Por el valor de la producción, la guayaba es importante para el sector productivo ya que se ha ubicado por arriba de los mil millones de pesos en los últimos dos años (Cuadro 4) y ocupa el décimo lugar entre los frutales económicamente más importantes de México (Cuadro 5).

Cuadro 4. Registros de la producción de guayaba en México de 1998 a 2007.

Años	Superficie sembrada (ha)	Superficie cosechada (ha)	Producción (t)	Rendimiento (t.ha ⁻¹)	Precio Medio Rural (\$t ⁻¹)	Valor de la Producción (Miles de Pesos)
1998	21,308	11,910	118,567	9.955	3,775	447,583
1999	19,554	17,388	239,856	13.794	4,279	1,026,248
2000	20,619	19,334	254,160	13.146	3,106	789,537
2001	20,445	19,994	263,414	13.175	3,054	804,588
2002	22,828	22,034	281,946	12.796	3,064	863,960
2003	23,317	22,631	299,173	13.220	2,774	829,774
2004	23,387	22,608	302,649	13.387	2,601	787,113
2005	23,561	23,072	308,380	13.366	2,773	855,016
2006	23,879	23,206	310,921	13.398	3,441	1,069,738
2007	23,621	22,841	267,912	11.729	3,998	1,070,981

Fuente: SAGARPA, 2007.

Cuadro 5. Registros de la producción de los frutales más importantes de México.

Cultivo	Superficie Sembrada (ha)	Superficie Cosechada (ha)	Producción (t)	Rendimiento (t.ha ⁻¹)	Precio Medio Rural (\$t ⁻¹)	Valor de la Producción (Miles de Pesos)
Aguacate	117,312	110,377	1,142,892	10	10,517	12,019,378
Plátano	82,090	75,651	1,964,545	26	2,661	5,227,920
Café cereza	800,910	772,036	1,458,804	2	3,335	4,865,693
Naranja	336,234	330,290	4,248,715	13	1,071	4,549,347
Mango	179,210	170,549	1,643,355	10	2,495	4,100,368
Limón	151,267	144,004	1,922,592	13	2,125	4,085,625
Manzana	59,969	56,072	505,078	9	5,617	2,837,217
Papaya	22,623	20,946	919,425	44	2,933	2,696,882
Durazno	45,584	41,733	192,261	5	6,166	1,185,558
Guayaba	23,621	22,841	267,912	12	3,998	1,070,981

Fuente: SAGARPA, 2007.

México, está considerado como el segundo productor de guayaba en el mundo con más de 250,000 toneladas (Mitra *et al.*, 2008) con un consumo *per cápita* aproximado de 2.3 kg (Gaceta del Senado, 2007) (Figura 1).

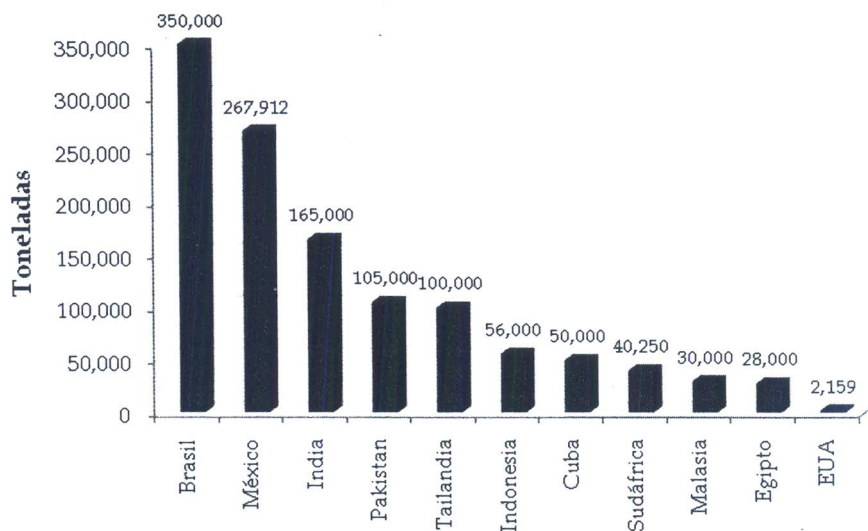


Figura 1. Producción de *P. guajava* L. en el mundo (USDA, 2009; Mitra *et al.*, 2008; Concepción, 2007).

2.9 Conservación del guayabo como recurso genético

2.9.1 Bancos de germoplasma o colecciones

El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias a través de los Campos Experimentales de Pabellón y de los Cañones inició trabajos de selección de germoplasma sobresaliente en la zona guayabera Calvillo-Cañones y estableció huertos con fines de evaluación en la década de los ochenta. De 1998 al 2001, se intensificaron los trabajos de caracterización de este banco de germoplasma para lograr en el futuro, el registro de materiales sobresalientes (González *et al.*, 2002).

2.9.2 Conservación *In situ*

La conservación *In situ* implica mantener la población de una especie en su hábitat natural ya sea en comunidades de plantas silvestres o en los campos de los agricultores como parte de un agroecosistema (Jarvis *et al.*, 1997). En el caso de los frutales, esta actividad la realizan los agricultores en sus huertos, solares o traspatios (Krishnamurthy y Sahagún, 1991). Particularmente, en las regiones tropicales de México, el guayabo se considera como uno de los frutales más comunes en los solares (Vara, 1994; Guzzy, 1986).

2.10 Avances biotecnológicos

P. guajava es una especie principalmente diploide con número cromosómico $2n= 22$. No obstante se han reportado cultivares triploides, tetraploides y aneuploides. Cultivares sin semillas presentan una división meiótica altamente anormal. El polen es funcional pero con frecuencia el crecimiento del tubo polínico se inhibe en el estilo lo que sugiere que existe algún tipo de incompatibilidad gametofítica (Nakasone y Paull, 1998).

Para el aprovechamiento de materiales sobresalientes se han desarrollado técnicas biotecnológicas como la propagación de explantes o generación de callo obtenidos de diferentes partes de la planta (hojas, semillas, polen, anteras) mediante cultivo de tejidos *in vitro*, lo que facilita la rápida multiplicación de las plantas (Negi y Rajan, 2007).

2.11 Manejo del cultivo del guayabo

González *et al.* (2002), hacen una descripción de las actividades propias del cultivo del guayabo con énfasis en la región Calvillo-Cañones, que incluyen diferentes prácticas de manejo agronómico. La huerta se debe establecer, de preferencia, con plantas provenientes de acodo aéreo y estacas para evitar la propagación de plagas y enfermedades de raíz y en partes altas con orientación

hacia el sur para evitar problemas por heladas. El guayabo puede adaptarse a diferentes tipos de suelo, pero se ha observado que la fruta que se produce en clima semiseco templado y en suelos con pH elevado tiene mayor consistencia y aroma que la producida en climas semiseco muy cálido con suelos ricos y profundos. El sistema de plantación más común es el marco real a una distancia de 7 x 7 m.

Para el riego después del trasplante, se requieren de 10 a 15 litros de agua por planta cada 15 días, se suspende durante la época de lluvias y reanuda en la canícula. Para controlar la época de cosecha, los productores de la región Calvillo-Cañones realizan el *calmeo*, que consiste en la suspensión del riego por un período de uno a seis meses durante la época seca, lo que ocasiona que el árbol se defolie y entre en estado de quiescencia, una vez que se aplica el primer riego o entra el período de lluvias el árbol se vuelve a reactivar. Por lo general el riego se aplica por gravedad o por microaspersión (González *et al.*, 2002).

Durante los primeros dos años es necesario podar el árbol para formar su estructura, con un tronco principal de 60 a 90 cm, con tres o cuatro ramas principales orientadas hacia los diferentes puntos cardinales. En adelante se deben eliminar brotes vigorosos, chupones o hijuelos para que no interfieran con el crecimiento del árbol, así como ramas excesivas o enfermas para mantener el equilibrio, sanidad y una forma adecuada para la cosecha. Hay que estimular el desarrollo de brotes horizontales o inclinados hacia el exterior, expuestos al sol, porque son los más productivos o realizar podas de fructificación. En Michoacán se utiliza la práctica de doblado o arqueado de brotes vigorosos para reducir el tiempo de inicio de la producción en árboles procedentes de semilla (González *et al.*, 2002).

Para realizar la fertilización con abonos orgánicos o minerales, previamente se debe voltear el suelo del cajete para eliminar la compactación excesiva posterior al *calmeo* y estimular el crecimiento de raicillas. Se recomienda la fórmula de fertilización 90-80-80 o la aplicación de estiércol (10 t.ha⁻¹) con los ajustes necesarios para cubrir los requerimientos del cultivo (González *et al.*, 2002). Algunos autores consideran que en los aspectos de nutrición del guayabo queda mucho por estudiar. De manera concreta se ha experimentado con fórmulas de fertilización y las respuestas han sido variables reflejadas principalmente en los rendimientos de fruto, tanto por la variabilidad genética dentro de las huertas como por los factores ambientales asociados, tipo de suelo y la disponibilidad de nutrimentos entre otros (Domínguez-Álvarez *et al.*, 2005).

Dentro de las plagas insectiles que atacan este frutal en la región Calvillo-Cañones se encuentran el picudo de la guayaba (*Conotrachelus* spp.) que oviposita en los frutos en etapa de canica (con 2cm de diámetro), y ha llegado a infestar hasta el 70 % de la superficie lo que ocasionó pérdidas del 60 % de la producción. Otra plaga es la mosca de la fruta (*Anastrepha striata*), que ataca los frutos en las últimas fases de crecimiento. El temolillo (*Cyclocephala lunulata*), coleóptero que se alimenta del fruto maduro de tamaño extra o primera y puede destruir hasta el 50% de la fruta que se cosecha en un corte (González *et al.*, 2002). En Michoacán, se presentan ataques por pulgones (*Aphis* spp.), frailecillo (*Macroductylus* spp.), escamas tortuga (*Chloropulvinaria psidii*) y tipo San José (*Quadraspidiotus perniciosus*), temolillo (*Cyclocephala lunulata*) y mosca de la fruta (*A. ludens*) (Luis *et al.*, 2003).

Las principales enfermedades en las regiones guayaberas de México son problemas radiculares por *Phytophthora* spp. y nematodos noduladores del género *Meloidogyne* spp., "clavo" que es una mancha de forma asimétrica que se desarrolla en la parte media de la hoja rodeando a la nervadura principal, es

causado por el hongo *Pestalotia psidii* y peca o “baqueteado” que son lesiones necrosadas rodeadas por un halo rojizo en el fruto asociado con deficiencias de Cu, Mn y Zn. Otras enfermedades que se presentan con menos frecuencia son el momificado de frutos causada por el hongo *Glomerella cingulata*, fumagina por los hongos *Capnodium* o *Meliola sp.*, pudrición de la corona por el hongo *Dothiorella sp.* y punta café que consiste en quemaduras en el ápice y bordes de las hojas, probablemente por exceso de minerales en el agua de riego (González *et al.*, 2002).

Otra actividad importante en el manejo de las huertas es el control de malezas, que se desarrollan en la parte superior de los cajetes y en las calles. Por su cobertura, peso seco y sistema radicular son el tercer factor de competencia para el cultivo. Se eliminan con machete curvo o con una podadora portátil, cuatro veces al año (González *et al.*, 2002).

La cosecha de la fruta se realiza en forma manual por la pendiente de los terrenos de cultivo. Se coloca en botes o cajas de plástico para trasladarse a la seleccionadora, se separa por tamaño y se empaca en cajas de 12 Kg para su comercialización (González *et al.*, 2002).

2.12 Usos de productos derivados del guayabo

2.12.1 Madera: Es de grano fino, moderadamente fuerte, con un peso de 650-750 Kg.cm⁻³, se utiliza en la carpintería para interiores y tornería para elaborar artesanías, juguetes y grabados. Cuando el árbol es parasitado por *Psittacanthus calyculatus* Don., se producen malformaciones llamadas “flores de madera” que se han utilizado como curiosidades ornamentales. Es un buen combustible como leña y carbón.

2.12.2 Corteza, hojas y raíz: Son ricas en taninos (10, 11 y 30 % respectivamente) y compuestos fitoquímicos como flavonoides, aceites esenciales, terpenoides, carotenoides, saponinas, fenoles etc., que se han aprovechado en la medicina tradicional principalmente para tratar malestares estomacales, úlceras, inflamaciones, parásitos, espasmos, etc. Actualmente se evalúa su efectividad como antibiótico, antioxidante, antimutagénico y coagulante, entre otros. Además del uso medicinal, en países de Asia y de América central se obtiene un pigmento negro para teñir seda y algodón de manera artesanal (Morton, 1987; Matsuo *et al.*, 1994; Arima y Danno, 2002).

2.12.3 Frutos: Además de consumirse en fresco se utilizan en la elaboración de jugos, néctares, mermeladas, compotas, cascots en almíbar, pastas, ates, jaleas, concentrados, muchos de los cuales se consumen directamente o se utilizan como materia prima en productos de panadería, pastelería, repostería y bebidas refrescantes, entre otras (Morton, 1987).

La guayaba es importante por su elevado contenido de vitamina C, superior al de los cítricos, además contiene vitaminas del complejo B y minerales como el calcio, hierro y fósforo (Cuadro 6).

Cuadro 6. Contenido nutricional de la guayaba en 100 g de porción comestible.

Compuesto	Contenido	Compuesto	Contenido	Compuesto	Contenido
Calorías	36-50	Carbohidratos	9.5-10 g	Riboflavina	0.03-0.04 mg
Humedad	77-86 g	Calcio	9.1-17 mg	Niacina	0.6-1.068 mg
Fibra cruda	2.8-5.5 g	Fósforo	17.8-30 mg	Vitamina B ₃	40 U. I.
Proteína	0.9-1.0 g	Hierro	0.30-0.70 mg	Vitamina G ₄	35 U. I.
Grasas	0.1-0.5 g	Vitamina A	200-400 U. I.	Ácido ascórbico	56-600 mg
Cenizas	0.43-0.7 g	Thiamina	0.046 mg		

Fuente: Morton, 1987.

2.13 Instituciones con investigación y desarrollo tecnológico en guayabo

La Universidad Autónoma Chapingo, como una de las principales instituciones en el área agronómica en el país y a través de la línea de investigación denominada “Manejo integrado de la guayaba (*Psidium guajava* L.)” ha contribuido a la colecta, caracterización morfológica y molecular del guayabo en 24 estados de la República en busca de selecciones y variedades así como el diseño e implementación de prácticas culturales acordes con el medio ambiente (Cuadro 7).

Cuadro 7. Instituciones y líneas de investigación enfocadas al cultivo del guayabo.

Institución	Centros de investigación	Áreas de investigación
Universidad Autónoma Chapingo	Dirección de Centros Regionales	Mejoramiento genético, Marcadores moleculares, Nutrición y Manejo del cultivo.
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias	Campos Experimentales “Pabellón”, “Calera” y “Los Cañones”	Mejoramiento Genético, Marcadores moleculares, Plagas y enfermedades, Manejo del cultivo, Bioquímica, Conservación Postcosecha y Aspectos económicos.
Colegio de Postgraduados	Programas de Botánica, Fitopatología, Edafología y Fruticultura	Fisiología, Fenología, Manejo del cultivo, Estrés hídrico, Patógenos, Bioquímica, Conservación Postcosecha, Aspectos económicos.

Destaca la labor del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias por sus avances en la selección de material genético y en la generación de tecnología para el manejo del cultivo en las principales zonas productoras del país. También, en el Colegio de Postgraduados se ha realizado investigación relacionada principalmente con el manejo del cultivo y la producción (Cuadro 7).

2.14 Prioridades de investigación en guayabo y descripción del presente trabajo

Dentro de los principales aspectos que pueden considerarse como prioridades de investigación para fortalecer el cultivo, manejo y comercialización de la guayaba en México se enlistan los siguientes (SAGARPA, 2007; Domínguez, 2004; Tapia, 2006; González *et al.*, 2002).

- ✚ Obtención de plantas eficientes adaptadas a ambientes restrictivos tales como deficiencias nutrimentales, déficit hídrico, suelos alcalinos y salinos, entre otras.
- ✚ Liberación de selecciones o variedades avanzadas, de alto rendimiento y calidad, para establecer nuevos huertos comerciales.
- ✚ Diseñar estrategias de adopción por los agricultores y posicionamiento en el mercado Nacional y/o Internacional.
- ✚ Generar variedades específicas para procesos de industrialización de alimentos con alto rendimiento en planta e identificar canales de comercialización de los productos procesados en el mercado Nacional y/o Internacional.
- ✚ Capacitación en el uso de herramientas moleculares para asistir los trabajos de mejoramiento genético y reducir los tiempos requeridos en el mejoramiento convencional.
- ✚ Generación de paquetes tecnológicos acordes a las nuevas selecciones y variedades para cada zona de producción en el país.
- ✚ Vinculación entre los diferentes centros de investigación para evitar la duplicidad de trabajos y lograr el aprovechamiento óptimo de sus recursos humanos, instalaciones y equipos, así como la gestión conjunta del financiamiento.

En este contexto, y en un marco de colaboración entre el Instituto de Horticultura, el Sistema de Centros Regionales de la Universidad Autónoma

Chapingo y el Instituto de Fitopatología del Colegio de Postgraduados, se llevó a cabo la presente investigación relacionada con la variabilidad morfológica y molecular de colecciones de guayabo y la medición del efecto de deficiencias nutrimentales y su asociación con marcadores moleculares en diferentes tipos de guayabo. La investigación fue dividida en dos apartados: 1) Un estudio sobre la distribución de la variabilidad ecogeográfica ligado al análisis de la variabilidad morfológica y de perfiles RAPD de las colecciones de guayabo. 2) Una revisión de la relación entre los descriptores morfológicos, perfiles RAPD y las deficiencias de micronutrientes inducidas en diferentes tipos de guayabo. Los resultados se presentan en cuatro capítulos.

El segundo capítulo está dedicado a un análisis bibliográfico de los conocimientos actuales sobre la especie en general y sobre los materiales cultivados en particular. Los capítulos III y IV exponen parte de los resultados obtenidos y con los títulos “Distribución geográfica potencial del guayabo (*Psidium guajava* L.) en México” y “Eliminación de compuestos oxidativos para incrementar la calidad y cantidad de ADN extraído de hojas de guayabo” se presentaron como Ponencia y Cartel, respectivamente, en el 2nd International Symposium on Guava and Other *Myrtaceae*, Mérida, México, Nov. 10-13 del 2008 y se prepararon para su publicación en la revista *Acta Horticulturae*.

Los capítulos V y VI contienen la mayor parte de los resultados de este trabajo y se titulan “Variación morfológica y molecular de tipos de guayabo (*Psidium guajava* L.) de México” y “Variabilidad genética, efecto de deficiencias de micronutrientes y su relación con marcadores moleculares en plantas de guayabo (*Psidium guajava* L.) presentado como Cartel en el “Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe” el 16 de Noviembre del 2007. El capítulo VII de discusiones y perspectivas muestra la contribución hacia una comprensión de la distribución potencial y la variabilidad de la especie, así

como su relación con las deficiencias nutrimentales con el fin de asegurar su conservación y una mejor utilización de los recursos genéticos del guayabo en México.

Para lograr los objetivos propuestos, las etapas en las que se dividió este estudio se desarrollaron en diferentes ámbitos de trabajo y colaboraciones en el marco del Instituto de Horticultura de la Universidad Autónoma Chapingo (Cuadro 8).

Cuadro 8. Instituciones y nivel de colaboración en el presente trabajo de investigación.

Departamento	Institución	Colaboración
Centros Regionales	Universidad Autónoma Chapingo	Dirección y Asesoría de la Tesis, Material biológico y reactivos
Departamento de Suelos	Universidad Autónoma Chapingo	Asesoría y reactivos
Programa en Fitosanidad	Colegio de Posgraduados	Asesoría y laboratorio
Programa en Botánica	Colegio de Posgraduados	Asesoría y reactivos
Fundación Produce	Asociación Civil	Principal fuente de financiamiento
Zacatecas		
Dirección General de Investigación y Postgrado	Universidad Autónoma Chapingo	Recursos económicos
Coordinación del Instituto de Horticultura	Universidad Autónoma Chapingo	Recursos económicos, invernadero y laboratorio

III. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA POTENCIAL DEL GUAYABO (*Psidium guajava* L.) EN MÉXICO

POTENTIAL BIOGEOGRAPHIC DISTRIBUTION OF GUAVA (*Psidium guajava* L.) IN MEXICO

Esmeralda Cázares Sánchez¹, Carlos Alberto Núñez Colín¹, Reyna I. Rojas Martínez⁴, José Luis Domínguez Álvarez³, César del C. Luna Morales¹, Sergio D. Segura Ledesma²,

Universidad Autónoma Chapingo: ¹Instituto de Horticultura, ²Centro Regional Universitario Centro Occidente, ³Centro Regional Universitario Anáhuac. Colegio de Postgraduados: ⁴Programa de Fitosanidad.

3.1 Resumen

La presente investigación se realizó con la finalidad de conocer la distribución potencial actual de la especie *Psidium guajava* L. en México, a partir de datos pasaporte de colectas de herbario mediante un Sistema de Información Geográfica (SIG). Se formaron cuatro grandes grupos cuya distribución obedece a la temperatura, precipitación y altitud. La mayor probabilidad de encontrarlos coincide con las provincias donde se desarrolla vegetación tropical de manera natural, serranías meridionales y límites con la

Abstract

This research was conducted with the purpose of knowing the potential distribution of the current species of *Psidium guajava* L. in Mexico by the analysis of Geographic Information System (GIS) from passport data of herbarium collections. Guavas were biogeographically divided into four major groups whose distribution is due to variable weather temperature, precipitation and elevation and more likely to find similarities with the regions where tropical vegetation develops in a natural way, such as

planicie costera del noroeste, costa del Golfo de México, serranías transísmicas y la península de Yucatán. El primer grupo se desarrolla alrededor de los 251 msnm, con temperatura media anual de 25 °C, máxima de 33 °C y mínima de 15 °C y con una precipitación anual de 1829 mm. El segundo grupo se desarrolla alrededor de los 54 msnm, con temperatura media anual de 26 °C, máxima de 33 °C y mínima de 18 °C y una precipitación anual de 1180 mm. El tercer grupo se ubica a 1166 msnm, con temperatura media anual de 21 °C, máxima de 31 °C y mínima de 9 °C, así como una precipitación pluvial de 948 mm al año. El cuarto grupo se encuentra a 1208 msnm, con temperatura media anual de 19 °C, máxima de 27 °C y mínima de 10 °C y una precipitación pluvial de 1770 mm al año. Los tipos de clima asociados con estas distribuciones son los cálidos y semicálidos subhúmedos. El uso del sistema GIS, facilita la ubicación de las zonas climatológicas potenciales para el desarrollo de recursos fitogenéticos, de tal manera que se puede utilizar como herramienta para delimitar las zonas de colecta de material vegetal ya sea para su identificación, conservación o estudio a través de programas de mejoramiento genético.

Palabras clave: *Psidium guajava* L., especie tropical, SIG, recursos fitogenéticos.

slopes in the Gulf of Mexico and pacific, some parts of the central region of Mexico, and the Yucatan peninsula. The first group was placed around the 251 meters of altitude, with average annual temperature of 25 °C, maximum of 33 °C and minimum of 15 °C and with an annual total precipitation of 1829 mm. The second group is developed around the 54 m, with average annual temperature of 26 °C, maximum of 33 °C and minimum of 18 °C and a total precipitation of 1180 mm per year. The third group is developed at 1166 m, with average annual temperature of 21 °C, maximum of 31 °C and minimum of 9 °C and total precipitation of 948 mm per year. The fourth group is at 1208 m, with average annual temperature of 19 °C, maximum of 27 °C and minimum of 10 °C and total precipitation of 1770 mm per year. The types of weather associated with these distributions are subhumid warm and less warm. The use of GIS makes the location of potential climatic zones easier for the development of plant genetic resources, so that can be used as a tool to delineate areas of collecting plant material either for identification, preservation, establishment of breeding programs or management of banks of germplasm.

Keywords: *Psidium guajava* L., tropical species, GIS, plant genetic resources.

3.2 Introducción

El guayabo (*Psidium guajava* L.) es un frutal que pertenece a la familia Myrtaceae, nativo de América tropical. Se distribuye de manera natural desde México hasta Perú y Colombia en América del Sur, así como en las islas Antillanas. Como cultivo es importante en todas las áreas tropicales del mundo (Bourke, 1976; Ferrão, 1992).

En México se han realizado trabajos de distribución geográfica de *P. guajava* L. Guzzy (1986) elaboró mapas de distribución de genotipos cultivados y silvestres con base en listados de los principales municipios y entidades productoras de guayaba y referencias geográficas de sitios de colecta de 195 accesiones consultadas de los herbarios de la Universidad Nacional Autónoma de México (MEXU y FCME) y del Instituto Politécnico Nacional (ENCB). Pennington y Sarukhán (2005), en un mapa señalan las vertientes del golfo y del pacífico como áreas de distribución de *P. guajava* silvestre. Ambos coinciden en que la especie, ya sea silvestre o cultivada se distribuye principalmente en las zonas donde se desarrolla de manera natural la vegetación tropical en el país.

En general, los modelos utilizados para conocer la distribución de las especies representan una importante herramienta en estudios de biogeografía, evolución, ecología, conservación y manejo de especies invasivas (Rajan *et al.*, 2007). Los sistemas de información geográfica se han convertido en una herramienta eficaz para la ubicación de las zonas eco-climáticas donde se desarrollan los recursos fitogenéticos, ya que al establecer previamente las zonas de recolecta de material vegetal, ya sea para su identificación, conservación o estudio a través de programas de mejoramiento genético, se reducen los costos por la adecuada planeación de las salidas de campo (Jones *et al.*, 2002). Además, este tipo de herramientas también pueden ser útiles para identificar zonas con características apropiadas para el manejo de especies de importancia económica

(Sánchez-Cordero y Martínez-Meyer, 2000). Por lo tanto, este estudio tiene como objetivo encontrar la probable distribución del guayabo en México con ayuda de Sistemas de Información Geográfica (GIS) y hacer una caracterización eco-climática para conocer y definir los distintos ambientes en los que éste se desarrolla.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Colección de datos

Se revisaron los datos pasaporte de 1076 colecciones de *Psidium guajava* L. ubicadas en herbarios incorporados a la Red Mundial de Información Sobre Biodiversidad-Especímenes (CONABIO, 2005) y se obtuvo la información sobre latitud y longitud del sitio de colecta. Los valores de altitud se adquirieron mediante el paquete Google Earth (2005) y enciclopedias electrónicas (CEDEMUN, 2000). Del total de ejemplares resguardados, 22 se encuentran en el Banco Nacional de Germoplasma Vegetal de la Universidad Autónoma Chapingo (BANGEV), 448 y 138 en los herbarios del Instituto de Ecología A. C. *campi* Xalapa (XAL) y Bajío (IEB) respectivamente; 107 en la University of Texas en Austin (LL, TEX); seis en la Universidad de Sonora (USON); 98 en la Universidad Nacional Autónoma de México (MEXU); 92 en el Jardín Botánico de Missouri (MO), siete en la Universidad de Arizona EUA (ARIZ), 157 en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) y uno en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste (CIBNOR).

3.3.2 Análisis de datos

Con la información sobre latitud, longitud y altitud de todos los especímenes de herbario se realizaron mapas de la distribución probable de la especie, mediante zonas obtenidas por una caracterización eco-climática con Floramap, que es un programa especializado para predecir y mapear la distribución o áreas de posible adaptación climática de especies silvestres, a

partir de datos asociados (Jones y Gladkov, 1999). Este paquete se ha utilizado satisfactoriamente en el género *Passiflora* en países Andinos (Segura *et al.*, 2003), en el género *Crataegus* en México (Núñez-Colín *et al.*, 2008a), así como en la identificación de las áreas más apropiadas para establecer colecciones núcleo de *Phaseolus* en el continente Americano (Tohme, *et al.*, 1995).

Las variaciones climáticas se obtienen por pixel de cada accesión localizada y con este conjunto de datos, se realiza un análisis de componentes principales (ACP) para reducir la dimensionalidad, con la matriz de varianzas-covarianzas. Para generar escalas comparables se hace una ponderación para cada grupo de variables y una transformación de datos para la precipitación. Para marcar el radio de probabilidad de la distribución estimada para cada píxel dado, se utiliza una distribución normal multivariada con un análisis de conglomerados (AC) mediante el método de Ward y con esto FloraMap separa las accesiones para identificar la localización de grupos con diferente clima y genera las gráficas correspondientes además de un mapa, en el cual se presenta la distribución climática potencial donde el organismo puede existir, pero no toma en consideración factores como el suelo o los vientos (Jones *et al.*, 2002).

Para identificar y describir las posibles zonas de distribución, se compiló información sobre la región con base en divisiones florísticas, características del clima y tipo de vegetación propios de cada grupo formado, mediante mapas (IG-UNAM, 1992), literatura sobre clasificación climática (García, 1988) y tipos de vegetación tropical de México (Rzedowski, 1978).

3.4 Resultados y discusión

De los estados donde se realizaron las colecciones de *Psidium guajava* L. resguardadas en los herbarios, destacan Veracruz, Yucatán, Quintana Roo, Oaxaca, Chiapas y Campeche por el número de ejemplares registrados, lo que

sugiere un mayor interés de los colectores por los genotipos encontrados en estos lugares (Cuadro 1).

Cuadro 1. Sitios de colecta de las muestras botánicas de *Psidium guajava* L.

Estado	No. de municipios	No. de ejemplares	Estado	No. de municipios	No. de ejemplares
Baja California Sur	1	1	Nayarit	8	23
Campeche	7	56	Nuevo León	1	6
Chiapas	14	59	Oaxaca	22	63
Chihuahua	1	2	Puebla	2	3
Colima	3	5	Querétaro	5	26
Durango	3	6	Quintana Roo	5	76
Estado de México	1	2	San Luis Potosí	2	7
Guanajuato	1	2	Sinaloa	2	6
Guerrero	8	24	Sonora	4	10
Hidalgo	5	13	Tabasco	2	4
Jalisco	9	19	Tamaulipas	6	29
Michoacán	11	35	Veracruz	75	445
Morelos	5	10	Yucatán	22	144
Total	69	234		156	842

3.4.1 Distribución general

Con valores del 75 al 95 % de probabilidad, el guayabo se distribuye en pequeñas áreas de la región de Baja California, la mayor parte de la costa pacífica, las serranías meridionales y límites con la altiplanicie, parte sur de la planicie costera del noroeste en los límites con la sierra madre oriental y costa del golfo de México hasta los límites con las serranías transísmicas y la península de Yucatán (Figura 1).

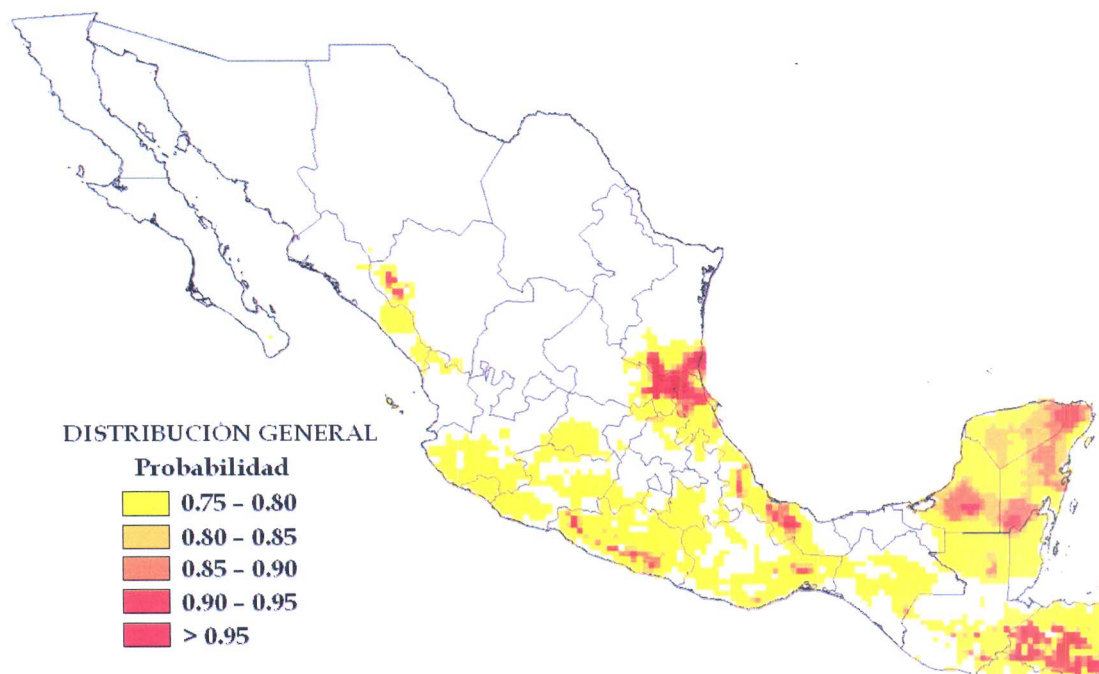


Figura 1. Distribución probable de *Psidium guajava* L. en México.

3.4.2 Caracterización eco-climática

Con el análisis de conglomerados realizado con GIS, se formaron cuatro grandes grupos (Figura 2) y a cada uno corresponde un ambiente específico.

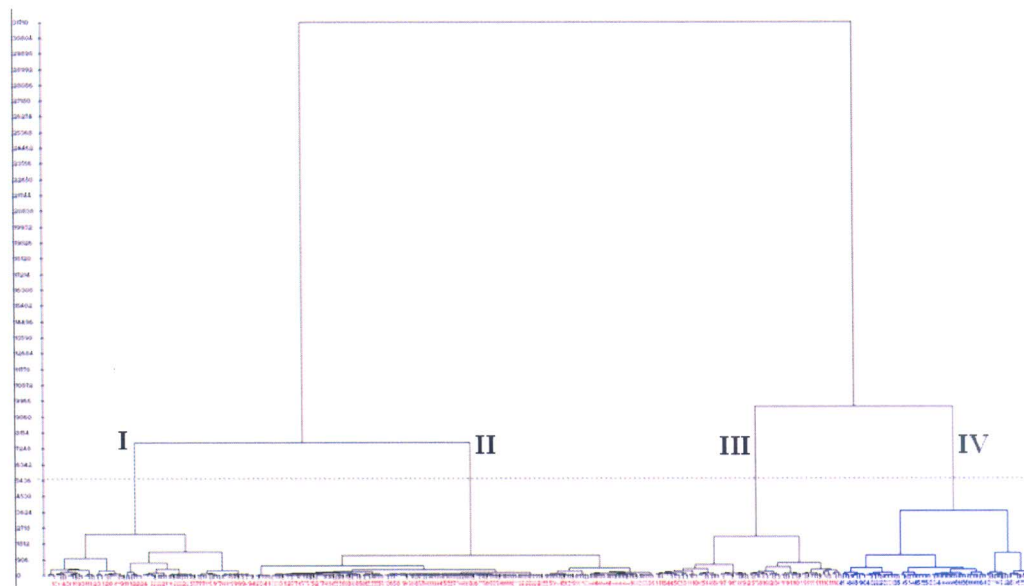


Figura 2. Dendrograma de las colecciones de *Psidium guajava* L. resguardadas en los herbarios analizados.

El grupo I está integrado por 218 registros de genotipos colectados a una altura promedio de 251 msnm y es posible que se encuentren de manera natural en el límite entre las provincias florísticas de la planicie costera del noreste y Baja California, algunas áreas de la costa pacífica, parte sur de la planicie costera del noroeste, costa del golfo de México y límites con las serranías meridionales, en esta última se observan los valores de probabilidad mayores (Figura 3).

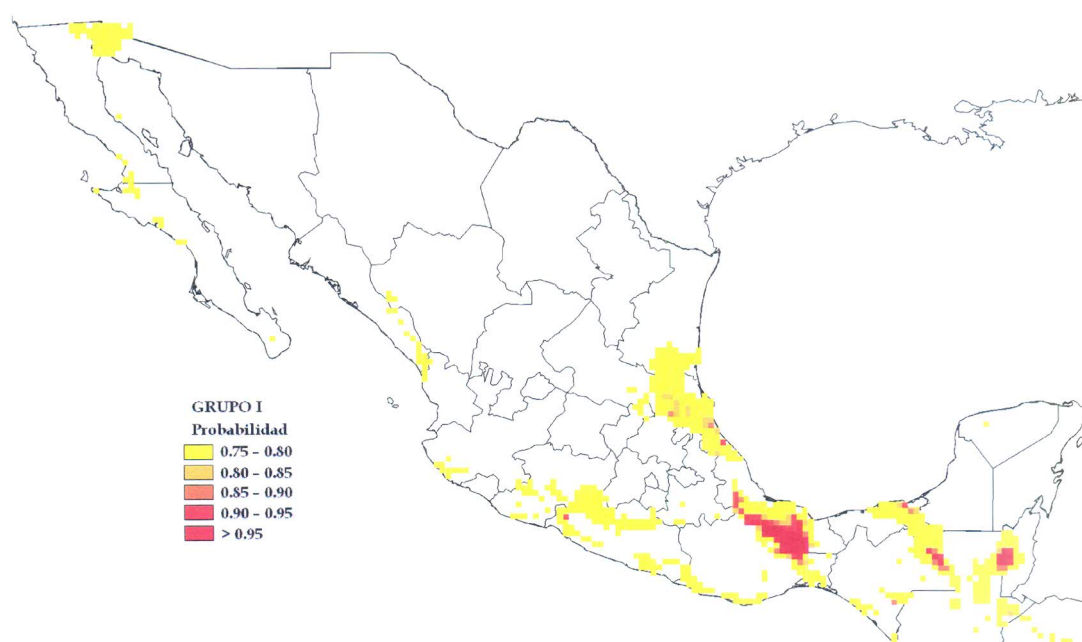


Figura 3. Distribución probable de *Psidium guajava* L. en México, para los individuos del grupo I.

Las características climáticas para este grupo son temperatura media anual de 24.8 °C, máxima de 33.2 °C y mínima de 15.2 °C, así como una precipitación pluvial de 1829 mm al año (Figura 7).

El grupo II, formado por 421 registros de genotipos colectados a una altura promedio de 54.2 msnm. Es posible encontrarlos en la provincia florística de la Península de Yucatán, con valores de probabilidad superiores al 90 % (Figura 4).

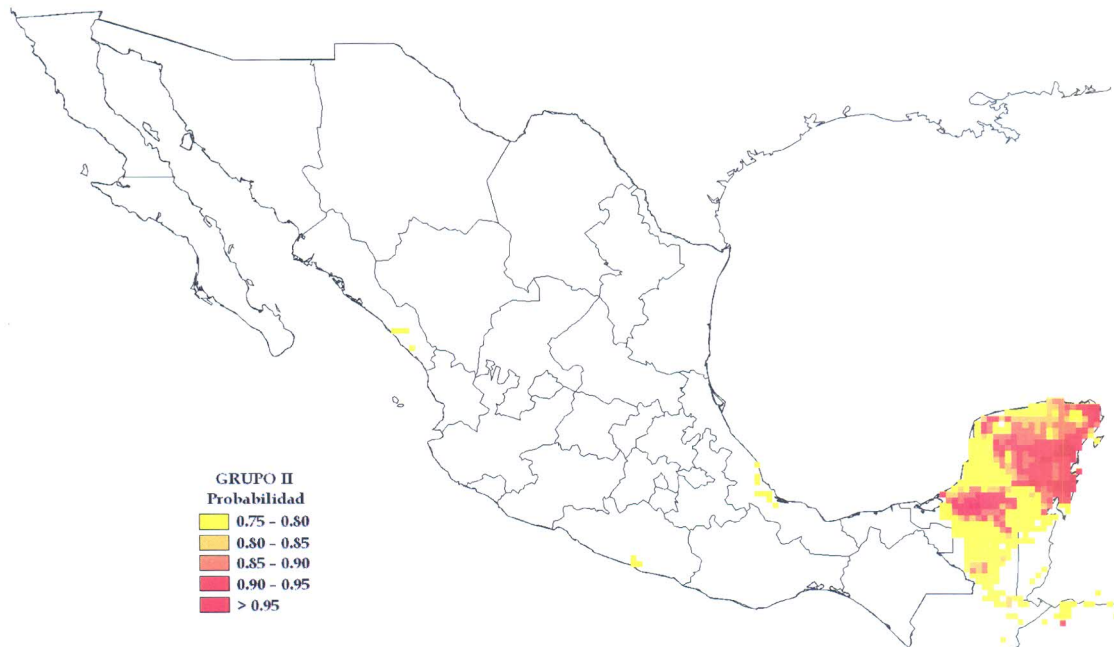


Figura 4. Distribución probable de *Psidium guajava* L. en México, para los individuos del grupo II.

Las características climáticas de este grupo son temperatura media anual de 25.7 °C, máxima de 32.6 °C y mínima de 18 °C y una precipitación pluvial de 1179.5 mm al año (Figura 7).

El grupo III formado por 196 registros de genotipos colectados a una altura promedio de 1165.7 msnm, tienen la mayor área de distribución y con probabilidades alrededor del 75 % es posible que se desarrollen en la planicie costera del noroeste con los límites de la sierra madre oriental y parte de las serranías transísmicas. Con probabilidades superiores al 90 % se les puede encontrar en las serranías meridionales y límites con la altiplanicie (Figura 5).

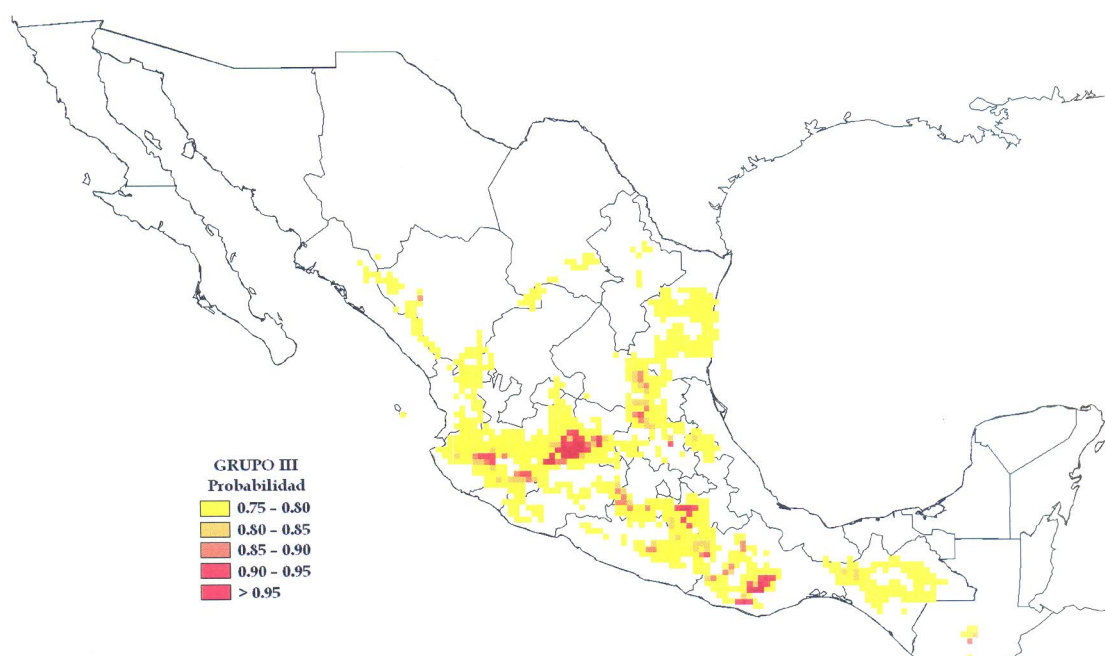


Figura 5. Distribución probable de *Psidium guajava* L. en México, para los individuos del grupo III.

Las características climáticas para este grupo son temperatura media anual de 20.8 °C, máxima de 31.4 °C y mínima de 9.2 °C, así como una precipitación pluvial de 947.6 mm al año (Figura 7).

El grupo IV, formado por 201 registros de genotipos colectados a una altura promedio de 1207.6 msnm, tienen una mayor probabilidad de encontrarse en los límites entre la sierra madre oriental y la costa del golfo de México así como algunas áreas de las serranías transísmicas (Figura 6).

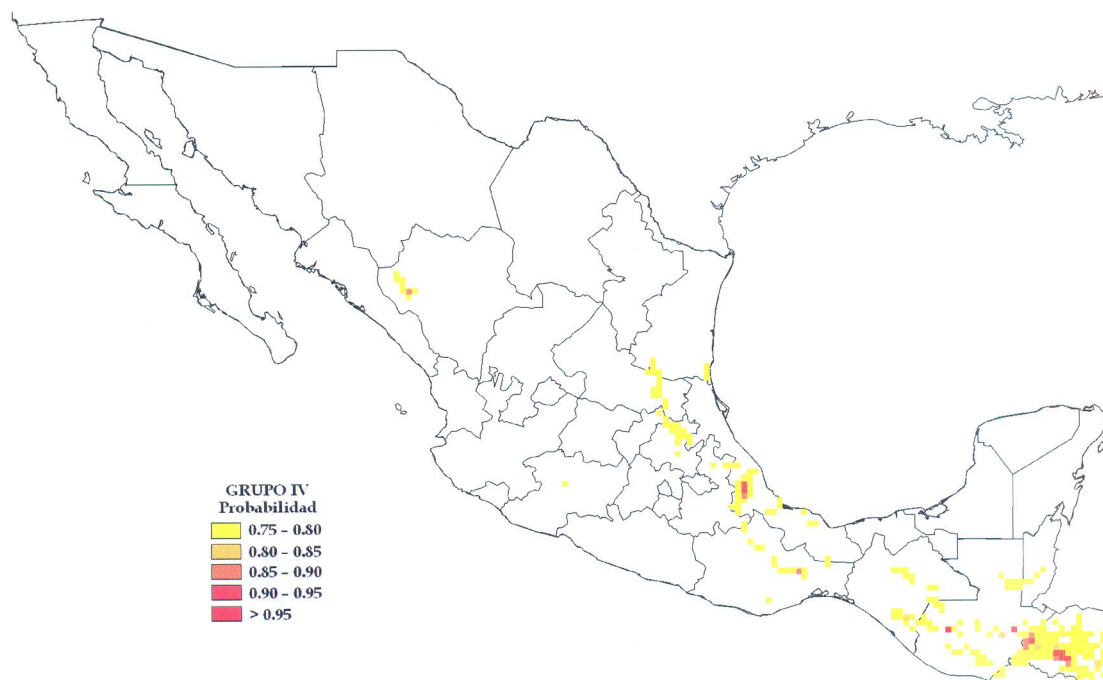


Figura 6. Distribución probable de *Psidium guajava* L. en México, para los individuos del grupo IV.

Las características climáticas de este grupo son temperatura media anual de 18.9 °C, máxima de 27.2 °C y mínima de 10.0 °C y una precipitación pluvial de 1770.3 mm al año (Figura 7).

En los grupos II, III y IV, se observa una disminución de la precipitación durante el mes de agosto, que se acentúa conforme incrementa la altitud. A este fenómeno se le conoce comúnmente como canícula (Figura 7).

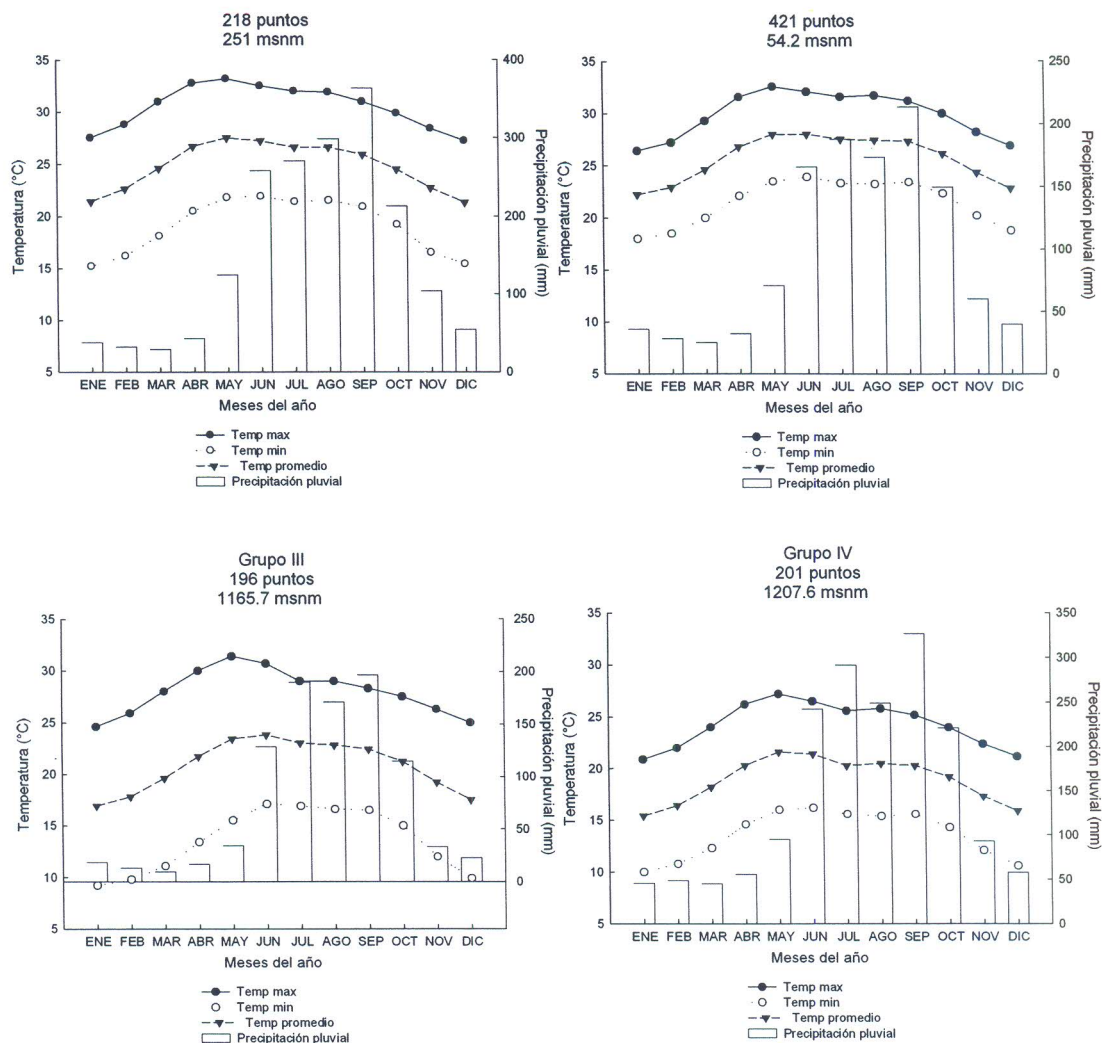


Figura 7. Condiciones de temperatura y precipitación pluvial características de los ambientes probables para el desarrollo de *P. guajava* L. en México.

Las áreas apropiadas para el crecimiento del guayabo se ubican por debajo de los 1000 msnm, con temperaturas óptimas entre 18 y 30 °C y una precipitación anual de 1000 a 2000 mm, alternando períodos secos con húmedos. En México las zonas principales donde se cultiva de manera comercial se encuentran entre los 1200 y 1700 msnm, con una temperatura media anual entre los 20 y 23 °C y precipitación entre los 550 y 1000 mm, por lo que se requiere de riegos de auxilio (González *et al.*, 2002; Nakasone y Paull, 1998). De acuerdo la clasificación de vegetación de Rzedowski (1978) y la de climas de García (1988),

los grupos I y II se desarrollan en las áreas típicas de bosque bajo y mediano caducifolio con climas Aw_2 y Aw_1 , respectivamente, es decir cálidos subhúmedos con lluvias en verano, con humedad intermedia para el primero y el más húmedo de los subhúmedos para el segundo. García (1988), describe a los climas A como tropicales lluviosos, muy cálidos, con una temperatura media del mes más frío alrededor de los 18 °C y específicamente el Aw con 10 veces mayor cantidad de lluvia en el mes más húmedo de la mitad caliente del año que en el mes más seco. Los individuos de los grupos III y IV se ubican en sitios con temperaturas medias arriba de los 18 °C y clima (A)C, considerado como semicálido dentro de los climas de tipo C. Por el régimen de precipitación pluvial el grupo III se clasifica como w_1 (intermedio), mientras que el grupo IV como w_2 (el más húmedo de los subhúmedos). Por lo tanto la distribución de los grupos III y IV en conjunto es mayor que la de I y II porque pueden desarrollarse en las regiones subtropicales y en las zonas de transición, mientras que los grupos I y II solo se encuentran en las regiones con climas tropicales.

En otros trabajos realizados en México mediante análisis SIG, Núñez-Colín *et al.* (2008), encontraron tres grupos de clima asociados a la distribución del género *Crataegus*, templado en el eje neovolcánico, semidesértico a desértico en el norte y noreste del país y subtropical en las zonas montañosas del pacífico sur y golfo de México, con la mayor probabilidad de desarrollarse en las zonas montañosas de la sierra madre oriental, sierra madre occidental, sierra madre del sur y el eje neovolcánico.

Los usos posibles de este tipo de trabajos se centran en la conservación de los recursos fitogenéticos y en la mejora de los cultivos, tareas de gran importancia en países de América Latina por considerarse como centros de origen de muchos cultivos importantes para la agricultura actual, cuya diversidad de poblaciones naturales está en peligro por la pérdida, degradación

y fragmentación de su hábitat, por lo que es necesario disponer de una reserva de genes que estén protegidos naturalmente en la variabilidad genética de cada especie (Zagaja, 1988; Rajan *et al.*, 2007).

La implicación más directa de los resultados de la presente investigación se relaciona con la conservación *in situ* y *ex situ* del guayabo en México. Las cuatro ecorregiones diferenciadas que se muestran en las figuras 3, 4, 5 y 6 requieren de acciones locales para mantener la variabilidad en esas áreas. Los sitios asociados a grupos étnicos establecidos en éstas, se sugieren como idóneos para la conservación *in situ* de la especie en México, ya que son los principales actores de este tipo de conservación (Vara, 1994; Guzzy, 1986).

En cuanto a la conservación *ex situ*, debido a que los bancos del INIFAP-Calvillo y el de la UACH contienen colectas principalmente de la zona centro y el altiplano del país, se recomienda incluir materiales de los grupos II, III y IV además, de ser posible, establecer una colección en la península de Yucatán y otra en la región del pacífico para garantizar su sobrevivencia en condiciones climáticas similares a sus lugares de origen.

La identificación y reunión de los materiales de guayabo en su entorno natural para su uso en programas de mejoramiento, permiten la incorporación de características deseables a los que actualmente se producen sobre una base comercial, tales como resistencia al ataque de plagas y enfermedades, mejorar las formas, tamaños, color, olor y el sabor de los frutos, la cantidad de pulpa, la capacidad productiva y reproductiva y la tolerancia a factores de estrés ambiental, entre otros. Asimismo, se puede asumir que cada uno de estos grupos sufrió diferentes cambios genéticos para adaptarse a diferentes hábitats (Dobzhansky, 1970), por lo tanto, al recolectar germoplasma de guayabo de zonas tropicales y subtropicales, se pueden obtener individuos con

características genéticas contrastes que servirían para generar mayor vigor híbrido en su descendencia (F1) mediante cruzamientos y potenciar las características deseables para la producción frutícola (Wright, 1978).

Otra aplicación de la información generada con esta herramienta consiste en la identificación de zonas aptas para el cultivo de la especie ya que los mapas de probabilidad y los climogramas ayudan a identificar si la región, de manera natural, es adecuada para este fin (Rajan *et al.*, 2007), de tal manera que se pueden identificar las zonas potenciales para establecer huertos comerciales o para extender las ya existentes, con la garantía de que los materiales cultivados contarán con ambientes apropiados para su desarrollo. En este caso, la distribución general de la especie en México propuesta en este trabajo, sugiere que provincias florísticas como la Península de Yucatán, sierra madre oriental en los límites con la planicie costera del noroeste, costa del golfo de México y costa pacífica reúnen las mejores condiciones ambientales para el establecimiento de huertos comerciales de guayabo, no obstante, es necesario considerar factores adversos como la presencia de plagas y enfermedades que pudieran limitar su desarrollo, para generar los paquetes tecnológicos adecuados a cada región y evaluar la pertinencia del establecimiento de los huertos.

3.5 Conclusiones

Los datos pasaporte de las colectas de herbario de guayabo fueron útiles para la generación de cuatro grupos de distribución probable de la especie en México, mediante el uso de Sistemas de Información Geográfica.

Los cuatro grupos identificados se desarrollan en ambientes delimitados por la altitud y regímenes de precipitación pluvial y temperatura, en los climas tropical, subtropical y semicálido.

Las áreas con mayor probabilidad de encontrar la especie corresponden a la península de Yucatán, costa del golfo de México, serranías meridionales y límites con la altiplanicie.

La distribución encontrada puede considerarse como una herramienta para la conservación del guayabo como recurso fitogenético, identificación de genotipos para mejoramiento genético e identificación de zonas aptas para su cultivo.

**IV. ELIMINACIÓN DE COMPUESTOS OXIDATIVOS PARA
INCREMENTAR LA CALIDAD Y CANTIDAD DE ADN EXTRAÍDO DE
HOJAS DE GUAYABO (*Psidium guajava* L.)**

ELIMINATION OF OXIDATIVE COMPOUNDS TO INCREASE THE QUALITY
AND QUANTITY OF DNA EXTRACTED FROM LEAVES OF GUAVA (*Psidium
guajava* L.)

Esmeralda Cázares Sánchez¹, Reyna I. Rojas Martínez⁴, Iobana Alanis Martínez⁶,
R. Marcos Soto Hernández⁵, Sergio D. Segura Ledesma², José Luis Domínguez
Álvarez³, César del C. Luna Morales¹

Universidad Autónoma Chapingo: ¹Instituto de Horticultura, ²Centro Regional
Universitario Centro Occidente, ³Centro Regional Universitario Anáhuac.
Colegio de Postgraduados: ⁴Programa en Fitosanidad, ⁵Programa en Botánica.
⁶SAGARPA.

4.1 Resumen

Con la finalidad de extraer ADN en cantidad y calidad suficiente a partir de hojas secas de guayabo conservadas por alrededor de un año, se probaron tres diferentes métodos; para esto fue necesario hacer algunas modificaciones que permitieron eliminar productos derivados de procesos oxidativos, compuestos promotores de oxidación, así como pigmentos, que de manera natural son

Abstract

With the aim of extracting DNA in sufficient quantity and quality from dried leaves of guava preserved for about a year, three different methods were evaluated. It was necessary to make some modifications to eliminate products derived from oxidative processes, oxidation promoting compounds, as well as pigments that are particularly abundant in the guava leaves and even more when they are

particularmente abundantes en las hojas de guayabo y aún más conservadas durante un período prolongado de tiempo a temperatura ambiente. Sólo se logró obtener ADN con uno de los métodos y se utilizó para realizar la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para verificar su concentración, se realizaron mediciones por espectrofotometría y la calidad se verificó con electroforesis así como diferentes pruebas de amplificación con PCR. El método también se probó en hojas frescas logrando obtener ADN con buenas características para llevar a cabo la reacción de PCR. Además de lo anterior, este método permitirá facilitar la recolecta de material vegetal en campo ya que no se requieren agentes crioprotectores para su traslado.

preserved for a long period of time at room temperature. Only with one of them DNA was obtained and was used to carry out the Polymerase Chain Reaction (PCR). To verify its concentration, measurements were made by spectrophotometry and the quality was verified by electrophoresis in agarose gels as well as by different tests with PCR amplifications. Also, the method was used with fresh leaves and DNA with good characteristics was obtained to conduct the PCR reactions. In addition, this method will allow making the collecting of plant material easier in the field because cryo-preservation agents are not required for the transportation of plant material.

Keywords: Extraction of DNA, dried leaves, phenolic compounds.

Palabras clave: Extracción de ADN, hojas secas, compuestos fenólicos.

4.2 Introducción

Los compuestos fenólicos son un grupo de sustancias que se encuentran en las plantas y que poseen en común un anillo aromático con uno o más hidroxilos. Tienden a ser solubles en agua y con frecuencia se combinan con azúcares o glicósidos y ocasionalmente con proteínas, alcaloides y terpenoides. Al grupo de los derivados de la ruta del ácido shiquímico o del acetato pertenecen los flavonoides, fenilpropanoides, quinonas, ligninas, melaninas y taninos y por lo general se localizan en la vacuola celular. Dentro de sus funciones se encuentra la estructural en la pared celular (ligninas), pigmentos en flores (antocianinas) y como factores de resistencia natural (Harborne, 1991). Particularmente en las hojas de guayabo, se ha detectado la presencia de estos

compuestos en forma de ácidos gálico (12.18 mg.g^{-1}), ferúlico (9.42 mg.g^{-1}), procatechuico, clorogénico, psidiólico y cafeíco, además de flavonoides (2610 mg.Kg^{-1} de hojas maduras) como la quercetina (12.26 mg.g^{-1}), aviculatina, guaijaverina y kampferol y un contenido importante de taninos (alrededor del 10 %) (Gutiérrez *et al.*, 2000). En general, se les atribuye un efecto antibiótico para tratar malestares gastrointestinales así como una potente actividad antioxidante al ser consumidos por el humano (Martínez *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2006; Chiu-Lan *et al.*, 2007). Otros compuestos presentes en los extractos de hojas de guayabo son aceites esenciales, carbohidratos reductores, aminoácidos, saponinas, triterpenos y esteroides (Rodríguez L. *et al.*, 1997).

Uno de los principales problemas para aislar el ADN de plantas, es la presencia de macro moléculas no deseables como los compuestos fenólicos, proteínas, carbohidratos y enzimas, principalmente, que se encuentran asociadas a él y dificultan su extracción ya que se aíslan de manera simultánea durante el proceso de purificación. Por ejemplo, cuando se maceran tejidos vegetales, se liberan enzimas polifenol-oxidasas y sus sustratos (polifenoles) de los compartimentos subcelulares. Estas sustancias forman quinonas que se condensan o combinan con proteínas llegando incluso a desnaturalizarlas (Nuez y Carrillo, 2000). En el caso de las hojas de guayabo, si este tipo de compuestos no se eliminan durante la extracción, posteriormente interfieren de manera negativa en el proceso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y en consecuencia no se logra la detección de huellas de ADN (Valadez y Kahl, 2000). En este contexto, el propósito del presente trabajo fue encontrar un método adecuado para obtener ADN en cantidad y calidad suficiente para llevar a cabo análisis finos como la PCR, a partir de hojas de guayabo.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Colecta y conservación de material vegetal

De cada árbol de interés, se seleccionaron ramas sanas con tres a seis pares de hojas incluyendo brotes tiernos. Se colocaron en una prensa botánica, entre hojas de papel periódico y cartón corrugado para lograr un proceso de deshidratación paulatino, por alrededor de 20 días con cambios de papel cada tercer día. Posteriormente, se separaron las hojas y brotes de los tallos y en conjunto se colocaron en sobres de papel que se mantuvieron en una bolsa de plástico negra en un lugar seco para su conservación. Hasta el momento de la extracción de ADN, el material vegetal tenía un año de haberse colectado. En total se procesaron 120 muestras, de las cuales, 78 fueron de tejido fresco conservado a -72 °C y 42 de tejido seco resguardado en las condiciones antes descritas.

4.3.2 Extracción y purificación de ADN

Para la extracción del ADN se probaron los métodos propuestos por De la Cruz *et al.*, (1997) y el kit Plant RNA Purification Reagent de Invitrogen (No. Cat: 12322-012) sin lograr obtener resultados positivos. Posteriormente, se realizaron modificaciones a los protocolos originales de Ahrens y Seemüller (1992) y Lee *et al.*, (1993). Con el fin de eliminar compuestos fenólicos, proteínas y carbohidratos que pudieran demeritar la calidad y cantidad del ADN extraído de las hojas de guayabo, se preparó amortiguador MLO con 10 g de PVP 40; 2.17 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$; 0.41 g de KH_2PO_4 ; 10 g de Sacarosa; 0.15 g de BSA y 0.50 g de Paraditerbutilfenol como antioxidante, el cual, presenta dificultad para disolverse en agua, por lo que se disolvió previamente en una mezcla de agua con alcohol etílico al 40 %. Posteriormente la mezcla del MLO se aforo con agua destilada hasta un volumen total de 100 mL. El amortiguador CTAB al 3 %, se preparo con Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M y 0.02 % de β -mercaptoetanol y nuevamente se agregaron 0.50 g de Paraditerbutilfenol como

antioxidante para coadyuvar a evitar que las muestras tomaran una coloración parda (asociada a procesos de oxidación) durante el tiempo de incubación a baño María. Al momento de incorporar el β -mercaptoetanol se observó un cambio de coloración del CTAB a lila, sin embargo, esta reacción no interfirió en el proceso de extracción de ADN.

Posteriormente, se maceraron 0.5 g de tejido de hoja en un mortero estéril con N líquido hasta obtener un polvo fino. Se agregaron 5.0 mL de MLO y la mezcla se repartió en 3 tubos eppendorf que se mantuvieron en hielo hasta concluir con el resto de las muestras. Se agitaron con vortex para homogeneizar la mezcla, se centrifugaron por 7 minutos a 14,000 rpm y se decantó el sobrenadante. Se adicionaron 800 μ L de amortiguador CTAB y se mezcló perfectamente. Se Incubó a baño María a 60 °C durante dos horas. Se adicionó un volumen de Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) por tubo y se mezcló suavemente hasta lograr una apariencia lechosa. Posteriormente, se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min. Se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos y estériles con cuidado de no tomar partículas sólidas; se agregó un volumen de Isopropanol frío, se mezclaron suavemente e incubaron a -20 °C durante 1 h. Se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min y se decantó el sobrenadante. Se dejó secar la pastilla en estufa a 37 °C por 30 min. Se agregaron 40 μ L de agua para resuspender el ADN, a 37 °C por 5 min. Se centrifugó por 3 segundos y se vaciaron los mismos ADN a un solo tubo. Se adicionaron 2 μ L de ARNasa A (10 mg.mL⁻¹) y se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Posteriormente, se agregaron 60 μ L de Acetato de Sodio 3M más 600 μ L de Isopropanol frío. Se mezcló suavemente e incubó a -20 °C durante 1 hora. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se dejó secar la pastilla de ADN en estufa a 37 °C por 30 min, se resuspendió en 100 μ L de agua a temperatura ambiente y se guardó a -20 °C.

4.3.3 Cuantificación y valoración de la calidad de ADN

La calidad del ADN se observó por medio de electroforesis en geles de agarosa 1 % corridos a 85 volts y se cuantificó con un espectrofotómetro Bio-10 Perkin -Elmer® a 260 nm de λ . Adicionalmente para corroborar si el ADN extraído era de buena calidad, se procedió a realizar un análisis de PCR, para lo cual, en un tubo para PCR se colocaron 4 μL de ADN ($20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 13.45 μL H_2O bidestilada estéril, 2.5 μL de amortiguador PCR 10X, 2.0 μL de MgCl_2 50 mM, 1.0, dNTP's 2.5 Mm, 2.0 μL de oligonucleótido al azar $10 \text{ pM} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 0.3 μL Taq ADN polimerasa $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, lo que suma un volumen total de 25 μL de mezcla de reacción. La amplificación se llevo a cabo en un termociclador Gene mod. 2400 de Perkin-Elmer® con las siguientes condiciones: Pre-desnaturalizado a 94°C por 1 min; 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 35°C por 30 seg y a 72°C por 1:30 min y para finalizar un ciclo para extensión a 72°C durante 2:30 min. Se utilizaron 20 iniciadores de 10 pb de la serie B de Operon Technologies, Inc. Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa al 1.5 % en amortiguador TBE (Tris base, Ácido bórico, EDTA 20 mM, pH 8) por medio de electroforesis a 90 volts por 2 h. En cada gel se utilizó marcador de 1Kb para identificar el tamaño de las bandas. Se cargaron 5 μL de ADN y 3 μL de colorante naranja G por cada pozo. Los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio al 0.01 % en agua destilada estéril, por alrededor de 10 min y se observaron en un transiluminador UV (Gel Doc 2000, Bio-Rad).

4.4 Resultados y discusión

Con el protocolo de De la Cruz *et al.*, (1997) y con el kit Plant RNA en la mayoría de las muestras evaluadas se logró extraer ADN; sin embargo éste se encontraba en bajas concentraciones ($0.02\text{-}0.43 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) y con el paso de los días, aún almacenadas a -20°C , se oxidaron cambiando su coloración (Figura 1) y los productos de PCR no generaron patrones de bandeo lo que sugiere que el ADN se degradó, posiblemente, por que los productos derivados de la oxidación o la

presencia de fenoles inhibieron la actividad de la ADN polimerasa y en consecuencia no hubo amplificación (Bloom *et al.*, 1996). De todos los materiales procesados, 13 muestras presentaron mayores problemas para extraer el ADN (ocho de tejido seco y cinco de fresco) y con éstas se probó el reactivo Plant RNA Purification Reagent de Invitrogen sin éxito.

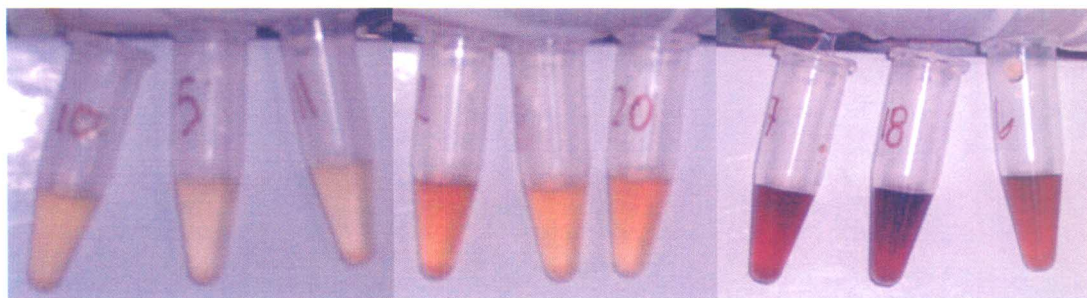


Figura 1. Cambio de coloración por procesos de oxidación de las muestras de ADN extraídas.

Con los protocolos modificados de Ahrens y Seemüller (1992) y Lee *et al.*, (1993), en una primera prueba se logró extraer el ADN de las 13 muestras que presentaron los mayores problemas por oxidación aunque la calidad no fue la mejor. Como se aprecia en el gel de calidad (Figura 2), la banda al inicio de cada carril indica la presencia de ADN, y en algunas muestras se observan picos laterales lo que sugiere degradación de éste; enseguida se observan barridos que se asocian con la presencia de carbohidratos, ARN e incluso proteínas, que no se eliminaron en su totalidad durante el proceso de purificación (Bloom *et al.*, 1996).

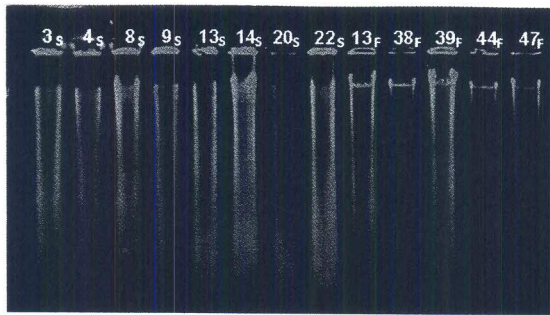


Figura 2. Gel de calidad del ADN de las muestras más problemáticas. S= Tejido seco. F = Tejido fresco.

En una segunda prueba de extracción se logró observar la banda de ADN en el gel de calidad con mayor nitidez y menor cantidad de impurezas (Figura 3).

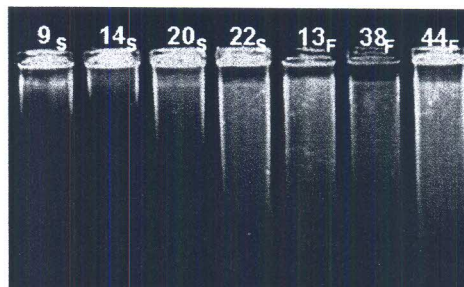


Figura 3. Gel de calidad del ADN de muestras problemáticas en una segunda prueba de extracción. S= Tejido seco. F = Tejido fresco.

Al realizar la prueba de PCR con algunos iniciadores (B1-B6, B12-B13) se observaron patrones de bandeo lo que indica que el ADN extraído tanto de tejido fresco como seco es adecuado para el proceso de amplificación (Figuras 4 y 5).

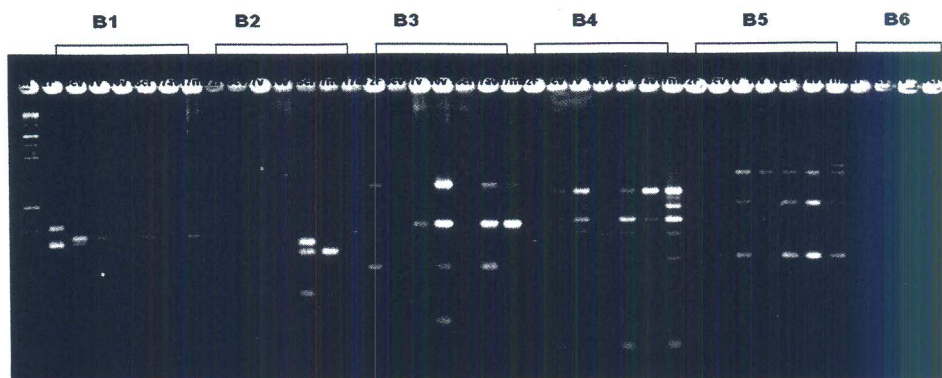


Figura 4. Patrones de bandeo de ADN extraído a partir de tejido fresco de hojas de guayabo.

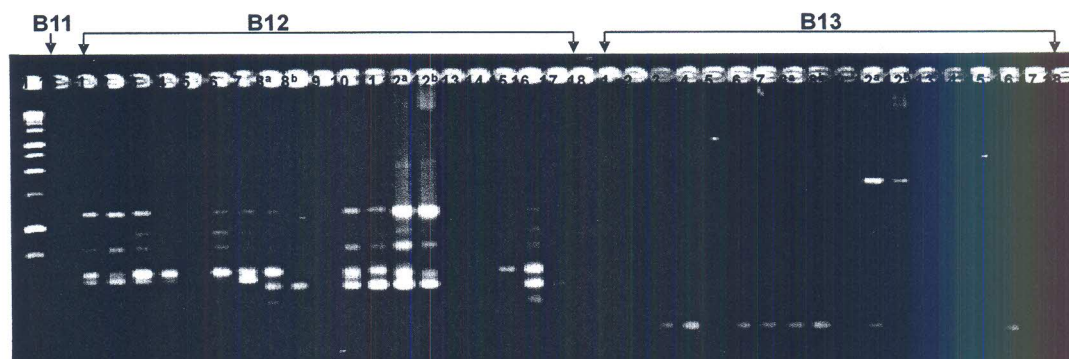


Figura 5. Patrones de bandeo de ADN extraído a partir de tejido seco de hojas de guayabo.

La obtención de ADN de mayor calidad tiene la ventaja de poder almacenarlo por períodos prolongados de tiempo, sin el riesgo de la oxidación. El protocolo propuesto por De la Cruz *et al.*, (1997), fue diseñado para obtener ADN de tejido de cactáceas, que si bien es susceptible a la oxidación, es posible que el contenido de compuestos fenólicos sea mucho menor que el de las hojas de guayabo lo que repercutió en la baja concentración de ADN obtenida. Al respecto algunos autores señalan que para poner a punto un protocolo de extracción de ADN a partir de tejidos vegetales, es necesario tomar en cuenta los contenidos de fenoles y polisacáridos, porque cuando los componentes celulares están juntos y las membranas son destruidas durante los procesos de

aislamiento, los fenoles rápidamente forman complejos con las proteínas mediante puentes de hidrógeno y como resultado se inhibe la actividad enzimática en los extractos crudos (Nuez y Carrillo, 2000; Harborne, 1991).

Los fenoles son muy susceptibles a la oxidación enzimática debido a la acción de fenolasas presentes en todas las plantas, es por eso que al triturar la muestra de tejido, el proceso de oxidación se acelera y puede provocar la pérdida del ADN. Para evitarlo al buffer de extracción se le adicionan compuestos antioxidantes como el β -mercaptoetanol (Nuez y Carrillo, 2000). En el proceso de extracción del ADN de las hojas de guayabo, además de este compuesto se agregó el Paraditerbutilfenol para reforzar la actividad antioxidante tanto en el MLO como en el CTAB, ya que como se indica en el protocolo, este último se utilizó para la extracción del ADN a baño María (proceso que fue necesario prolongar de 1 a 2 horas) y dicho antioxidante disminuyó la intensidad del oscurecimiento del tejido durante este paso. Valadez y Kahl (2000) señalan que los problemas generados por la presencia de compuestos fenólicos, pueden reducirse con la adición de polivinilpirrolidona (PVP) en concentración de 1 % o mayor en el amortiguador de aislamiento inicial. En este caso se agregó en un 10 % en el MLO y se logró eliminar una cantidad importante de compuestos oxidativos en un paso previo a la extracción del ADN con CTAB.

Otro aspecto importante durante el proceso de extracción es la presencia de hidratos de carbono solubles que pueden formar complejos con las proteínas. El ADN puede separarse de las proteínas y restos celulares mediante la precipitación con cloroformo, que permite obtenerlo con mayor pureza y menos sensible a la degradación (Nuez y Carrillo, 2000). Al respecto el protocolo propuesto ya incluía un paso de limpieza con cloroformo-álcool isoamílico (24:1).

Por último, al ADN extraído, se agregó ARNasa con el propósito de eliminar el ARN contenido en la muestra, posteriormente, con finalidad de elevar su calidad se realizó una segunda precipitación.

4.5 Conclusiones

Las modificaciones a los protocolos evaluados, fueron acertadas para lograr la extracción de ADN de hojas frescas y secas de guayabo en cantidad y calidad suficiente para realizar los procesos de PCR.

El método implica el uso de Paraditerbutilfenol como antioxidante, PVP en un 10 % y 2 horas de extracción como principales modificaciones.

Este método es altamente recomendable para procesar muestras provenientes de herbarios y de recolectas en campo.

**V. EVALUACION DE LA VARIABILIDAD DE TIPOS DE GUAYABO
(*Psidium guajava* L.) DE INTERÉS FRUTÍCOLA DE MÉXICO MEDIANTE
ANÁLISIS MORFOLÓGICO y RAPD**

**ASSESSING VARIABILITY AMONG THE EDIBLE TYPES OF GUAVA (*Psidium
guajava* L.) OF MEXICO DETECTED BY MORPHOLOGICAL AND RAPD
ANALYSIS**

Esmeralda Cázares Sánchez¹, Sergio D. Segura Ledesma², José Luis Domínguez
Álvarez³, César Del C. Luna Morales¹ y Reyna I. Rojas Martínez³

Universidad Autónoma Chapingo: ¹Instituto de Horticultura, ²Centro Regional
Universitario Centro Occidente, ³Centro Regional Universitario Anáhuac.
Colegio de Postgraduados: ⁴Programa de Fitosanidad.

5.1 Resumen

En México, el guayabo (*Psidium guajava* L.) es uno de los frutales de mayor importancia económica que se desarrolla en las regiones tropicales y subtropicales del país. Una colección de 49 accesiones de guayabo se caracterizó con 40 variables morfológicas y 20 marcadores RAPD para describir su variación genética, relacionarla con su origen geográfico, e identificar características prominentes en fruto. Se detectó variabilidad importante entre los genotipos con un polimorfismo del 88 %. A un

Abstract

In Mexico, the guava (*Psidium guajava* L.) is one of the most economically important fruit trees that develops in tropical and subtropical regions of the country. A collection of 49 accessions of guava was characterized with 40 morphological variables and 20 RAPD markers to describe the genetic variation associated with their geographical origin and identify prominent features in the fruit. Variability was detected between genotypes with a polymorphism of 88 %. A similarity

coeficiente de similitud de 0.35 se formaron 6 grupos y al 0.22 uno más, que se relacionan con provincias florísticas y rangos de altitud, latitud y longitud. Con el análisis de agrupamiento en función de caracteres morfológicos se formaron tres grupos principalmente por forma y tamaño de la hoja, presencia de pubescencia y coloración por antocianinas, forma de la nervadura central, color del brote y ángulo de inserción en el tallo. Respecto al fruto, destacan la forma (redondo-aperado) y tamaño (27-391 g), presencia de collar rígido alrededor de la cavidad del cáliz (discreto-llamativo), cantidad y peso de semillas (1.6-11.3 g), grosor de pulpa (5.0-18.42 mm) y contenido de sólidos solubles del mucílago (5.5-16.7 °Bx). Dos grupos muestran características deseables de fruto para el consumo en fresco y uno para la industria alimentaria. La variación encontrada puede ser útil para enriquecer las colecciones nacionales de la especie y apoyar la conservación de este recurso fitogenético; para ampliar la base genética de los tipos que actualmente se cultivan de manera comercial e incorporar caracteres de interés agronómico o de resistencia a factores biológicos y ambientales adversos; para generar variedades con características sobresalientes para la producción frutícola, que podrían ser de interés a los productores en el campo y para satisfacer los requerimientos del mercado nacional o de exportación.

Palabras clave: Mirtaceae, recursos fitogenéticos, provincias florísticas, fruto, hoja.

coefficient of 0.35 six groups were formed and at a 0.22 one more, which are related to floristic provinces and ranges in altitude, latitude and longitude. With the cluster analysis based on morphological characters three groups were formed primarily by size and shape of the leaf, presence of pubescence and coloration by anthocyanin, form of the central rib, color of the stem and angle of the insertion. Respect to fruit, are important the form (round-pear) and size (27-391 g), presence of rigid collar around the cavity of the calyx (discrete-striking), quantity and weight of seeds (1.6-11.3 g), thickness pulp (5.0-18.42 mm) and soluble solids content of the mucilage (5.5-16.7 °Bx). Two groups are desirable characteristics of the fruit for fresh consumption and one for the food industry. The variation found can be useful to enrich the national collections of the species and support the conservation of plant genetic resource, to expand the genetic base of the types currently grown on a commercial form and incorporate agronomic characters and resistance to biological factors and environmental impacts; to generate varieties with characteristics for fruit production, which might be of interest to producers in the country and to meet the requirements of the national market or export.

Keywords: Mirtaceae, plant genetic resources, floristic provinces, fruit, leaf.

5.2 Introducción

En la caracterización de una especie se estima la variabilidad existente en el genoma de la población de los individuos que la conforman. El genoma contiene la información codificada en forma de genes que se necesitan tanto para establecer su identidad morfológica como para desarrollar todos los procesos y funciones vitales para su supervivencia, mismo que en las plantas superiores, se estima en alrededor de 400,000 genes. A las características visibles se les denomina fenotipo y a la información genética se le llama genotipo (Hidalgo, 2003; Castillo, 1996; Stansfield, 1992).

A los caracteres cuyo patrón de herencia se puede seguir a nivel morfológico, bioquímico (enzimas) o molecular (ADN) se les denomina marcadores. La caracterización morfológica, permite la discriminación entre las accesiones mediante descriptores morfológicos, que son caracteres altamente heredables, detectables a simple vista y que se expresan de manera similar en todos los ambientes. También se pueden incluir caracteres considerados como deseables por consenso de los usuarios como colores y formas de tallos, hojas, flores, semillas y frutos (Hidalgo, 2003; Stansfield, 1992). La caracterización molecular es útil en la identificación de genotipos duplicados dentro de una colección, en la determinación del patrón genético o genotipos a través de huellas genómicas, en el análisis de la variabilidad genética de una colección y en el establecimiento de colecciones núcleo (Castillo, 1996).

Una de las técnicas utilizadas para el conocimiento de la información genética de las plantas es la amplificación al azar de ADN polimórfico (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD), capaz de detectar polimorfismos en la secuencia de los nucleótidos amplificados del ADN molde, con un solo iniciador constituido por una secuencia arbitraria de 10 pb compuesta en su mayoría por guanina y citosina (50-80 %). Los productos se separan fácilmente sobre geles de

agarosa por medio de electroforesis y se pueden visualizar con iluminación ultravioleta. Es una técnica rápida, simple, eficiente, requiere de poca cantidad de ADN (10 ng por reacción) y detecta altos niveles de polimorfismo (Williams *et al.*, 1990; Waugh y Powell, 1992).

La mayoría de las colecciones de germoplasma se realizan en función de expresiones fenotípicas lo que puede discriminar genes recesivos, por ello, en la exploración de estos recursos se recomienda un muestreo al azar de las poblaciones para garantizar una base genética amplia, que permita afrontar con éxito factores adversos de la naturaleza como temperaturas extremas, sequías, inundaciones, suelos salinos, plagas y enfermedades entre otros (Zagaja, 1988). También es importante contar con información sobre el origen geográfico de las accesiones, altitud, clima y suelo, la caracterización morfológica, la respuesta a factores bióticos y abióticos y la caracterización con marcadores moleculares: proteínas, enzimas o ADN. Estos grupos de información se encadenan para finalmente establecer criterios racionales que permitan estimar la variabilidad de la especie en estudio (Hidalgo, 2003).

México, es el segundo productor de guayaba en el mundo y a diferencia de países como Estados Unidos, la India, Tailandia, y Brasil, entre otros, la producción proviene de materiales no mejorados (Mitra *et al.*, 2008; Manica, 2000; González *et al.*, 2002). A manera de ilustración se tiene la región Calvillo-Cañones, considerada dentro de las tres principales zonas productoras, donde las plantas cultivadas son principalmente de los tipos conocidos como Media China y China propagados a partir de semillas o hijuelos, con el consecuente bajo rendimiento (González *et al.*, 2002). Dada la variabilidad de guayabo existente en nuestro país, es posible que con la recolección y evaluación de materiales se puedan obtener variantes sobresalientes que mediante

mejoramiento genético den origen a variedades con las características deseadas para procesos de industrialización específicos o para el consumo en fresco.

El equipo de investigadores del INIFAP, a través de los campos experimentales Pabellón y Los Cañones (Aguascalientes y Zacatecas), ha realizado trabajos de identificación y selección de material genético sobresaliente que proviene, principalmente, de las huertas establecidas con fines comerciales. En un estudio pionero Perales y Silguero (1995) reportaron variabilidad en la forma, color de la epidermis y contenido de sólidos solubles totales de los frutos en cultivares de Zacatecas. Padilla *et al.* (2003), caracterizaron fenotípica, química y reproductivamente un grupo de 24 selecciones de guayabo mediante 10 variables de las hojas y 11 características del fruto. Observaron una correlación positiva entre el diámetro ecuatorial con el grosor de pulpa y el número de semillas con el peso de semillas por fruto. El contenido de ácido ascórbico (vitamina C) varió de 217 a 485 mg.100 g⁻¹ de tejido. El crecimiento del fruto siguió una doble sigmoide consistente en tres fases características. Las selecciones superaron en dos a cinco veces la media de rendimiento de fruto en la región de estudio.

Hernández *et al.* (2003), determinaron la diversidad fenotípica y genotípica de árboles de cuatro huertas de guayabo (*Psidium guajava* L.) en Calvillo, Aguascalientes mediante características morfológicas y marcadores RAPD con 15 oligonucleótidos decaméricos, encontrando diferencias entre y dentro de ellas. Se observaron colores de pulpa crema, blanco, amarillo y rosa, así como formas de fruto ovalada y aperada; con el análisis RAPD se amplificaron 112 fragmentos polimórficos. Estos resultados de variación no pudieron ser relacionados con el origen de los materiales. En una segunda etapa, caracterizaron la diversidad productiva y genética mediante AFLP de 48 accesiones de *P. guajava* colectadas en la región Calvillo-Cañones de México,

además de dos accesiones de *P. cattleianum* y dos de *P. friedichsthalianum*. Éstas últimas produjeron menos de siete kilogramos de fruto por árbol y las accesiones de *P. guajava* produjeron 36 Kg con un peso promedio mayor a 50 g por fruto. El análisis AFLP amplificó 349 productos, de los cuales sólo el 8.9 % fue monomórfico agrupándose primeramente *P. cattleianum* y *P. friedichsthalianum* y en otro las accesiones de *P. guajava*, en este último se observó otro grupo que incluyó 11 de las 12 accesiones más productivas en campo a través de tres años de evaluación.

En trabajos de investigación realizados en la UACH, Domínguez (2004) utilizó 20 iniciadores RAPD en muestras de guayabo del tipo 'Media china' provenientes de plantaciones de los municipios de Juárez y Zitácuaro Michoacán y encontró que el 96 % de las bandas evaluadas fueron polimórficas, lo que indica un alto grado de variabilidad genética de los guayabos del occidente del país. En un estudio más amplio, Tapia (2006) evaluó genética y morfológicamente 32 materiales de guayabo provenientes de Nayarit, Chiapas, Morelos, Zacatecas, Michoacán, Tamaulipas, Veracruz y Brasil, con 30 iniciadores RAPD y encontró que 84.07 % de los productos amplificados fue polimórfico. Se evaluaron además 40 variables morfológicas y se observaron agrupamientos de las colectas respecto al lugar de origen.

Con base en estos trabajos el presente estudio tuvo lugar como parte del proyecto general "Manejo integrado de la guayaba (*Psidium guajava* L.)", de la Universidad Autónoma Chapingo cuyos objetivos fueron la colecta, caracterización morfológica y molecular del guayabo en 24 estados de la República Mexicana. En particular, el objetivo de esta investigación fue evaluar la variación morfológica y molecular e identificar características prominentes en fruto, en colecciones de guayabo procedentes de seis provincias florísticas de

México y algunos ejemplares de Brasil, con descriptores morfológicos UPOV, medición de variables en hoja y fruto y marcadores moleculares RAPD.

5.3 Materiales y métodos

5.3.1 Material Vegetal

La colecta del material vegetal se realizó en dos etapas. En la primera se realizó un estudio piloto para determinar el tamaño de muestra por ecorregiones (Cuadro 1). En la segunda etapa se hicieron 22 colectas y se agregaron 20 genotipos de la colección de germoplasma de guayabo ubicada en la comunidad del Chique, municipio de Tabasco, Zacatecas. La caracterización morfológica se llevo a cabo en la Universidad Autónoma Chapingo y la molecular en el Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados.

5.3.2 Determinación del tamaño de muestra para la colecta de material vegetal

Para ayudar a determinar el tamaño de muestra se hizo una colecta preliminar de hoja y fruto de guayabo en la zona Centro-Norte del estado de Veracruz, de donde se eligieron municipios de acuerdo a su configuración fisiográfica colectándose en total 35 genotipos con la mayor variabilidad posible, tomando en cuenta características de fruto, forma (redonda y periforme) y color de pulpa (roja, blanca y amarilla). Del total de colectas sólo fue posible analizar siete con marcadores moleculares (Cuadro 1).

Cuadro 1. Procedencia de los genotipos de guayabo colectados en las provincias florísticas sierra madre oriental, serranías meridionales y costa del golfo de México.

No. de colecta	Lugar de origen	Provincia florística	Características	Tipo de vegetación	Coordenadas	Altitud m.s.n.m.	Tipo climático
V02	Malila, Hidalgo	Sierra Madre Oriental	Criolla roja	Selva mediana caducifolia	20°45'0"N 98°43'0"W	1360	Aw
V03	Tempoal, Veracruz	Costa del Golfo de México	Criolla china, bola, alargada	Selva mediana caducifolia	21°31'24.5"N 98°23'22.89"W	76.2	Aw1
V07	Papantla, Veracruz	Costa del Golfo de México	Criolla hoja ancha	Selva alta perennifolia	20°27'24.95"N 97°18'57.5"W	168.9	Aw1
V10	Misantla	Costa del Golfo de México	Cultivada aperada roja	Selva mediana caducifolia	19°56' N 96°51'W	300	ACfm
V15	Jalapa, Veracruz	Costa del Golfo de México	Criolla rosada	Bosque Mesófilo de Montaña	19°31'21.18"N 96°52'7.8"W	1219.8	ACfm
V17a	Huatusco, Veracruz	Serranías meridionales	Amarilla	Selva alta perennifolia	19°13'3.0"N 96°58'19.02"W	1474.9	ACfm
V17m	Huatusco, Veracruz	Serranías meridionales	Morada	Selva alta perennifolia	19°13'3.0"N 96°58'19.02"W	1474.9	ACfm

Colector J.L. Domínguez A, 2004.

La información sobre el tipo de vegetación, clima, altitud y región propios de cada lugar de colecta, se obtuvo de mapas (IG-UNAM, 1992; INEGI, 1988), cartas de clima (CETENAL- UNAM, 1970) y enciclopedias electrónicas (CEDEMUN, 2000).

Para llevar a cabo la segunda etapa de la colecta de genotipos, se compiló la información sobre latitud y longitud de 1076 datos pasaporte de colecciones de guayabo ubicadas en herbarios incorporados a la Red Mundial de Información Sobre Biodiversidad-Especímenes (CONABIO, 2005). Los valores de altitud se obtuvieron mediante el paquete Google Earth (2005) y enciclopedias electrónicas (CEDEMUN, 2000). Posteriormente se realizaron mapas de la distribución probable de la especie en el país con el paquete Floramap 1.1 (Jones y Gladkov, 1999) que se presentaron a detalle en el capítulo III. Conforme a esta distribución se enlistaron un total de 106 municipios de México donde crecen

los tipos de vegetación tropical bosque tropical perennifolio, subcaducifolio, caducifolio y mesófilo de montaña (Rzedowski, 1978) y se les asignaron valores de probabilidad de encontrar *Psidium guajava* L., de los cuales uno corresponde al bosque mesófilo de montaña, 22 a la selva alta perennifolia, 23 a la selva mediana caducifolia y 60 a la selva baja caducifolia (Cuadro 2).

Cuadro 2. Valores de probabilidad de encontrar *Psidium guajava* L., en 109 municipios donde se desarrolla vegetación tropical en México.

ESTADO	MUNICIPIO	VEGETACIÓN	PROBABILIDAD
TABASCO	Centro	Selva alta perennifolia	0.525
	Huimanguillo	Selva alta perennifolia	0.525
	Aldama	Selva alta perennifolia	0.525
CAMPECHE	Calakmul	Selva mediana caducifolia	0.8499
	Calkiní	Selva baja caducifolia	0.725
	Campeche	Selva baja caducifolia	0.725
	Carmen	Selva mediana caducifolia	0.725
	Champoton	Selva mediana caducifolia	0.8499
	Hecelchakan	Selva baja caducifolia	0.725
	Hopelchén	Selva baja caducifolia	0.7999
	Tenabo	Selva baja caducifolia	0.725
YUCATÁN	Akil	Selva baja caducifolia	0.7999
	Chemax	Selva baja caducifolia	0.8499
	Chikindzonot	Selva baja caducifolia	0.8999
	Conkal	Selva baja espinosa caducifolia	0.7999
	Izamal	Selva baja caducifolia	0.8999
	Kantunil	Selva baja caducifolia	0.8999
	Kinchil	Selva baja espinosa caducifolia	0.675
	Maxcanu	Selva baja caducifolia	0.725
	Mérida	Selva baja caducifolia	0.8499
	Motul	Selva baja caducifolia	0.675
	Muna	Selva baja caducifolia	0.7999
	Oxkutzcab	Selva mediana caducifolia	0.7999
	Peto	Selva baja caducifolia	0.7999
	Santa Elena	Selva baja caducifolia	0.7999
	Tahdziu	Selva baja caducifolia	0.7999
	Teabo	Selva baja caducifolia	0.7999
	Tekax	Selva baja caducifolia	0.7999
	Tekom	Selva baja caducifolia	0.7999
	Temozon	Selva baja caducifolia	0.725
	Ticul	Selva baja caducifolia	0.7999
	Tinum	Selva baja caducifolia	0.7999
	Tixcacalcupul	Selva baja caducifolia	0.8499
	Tizimin	Selva baja caducifolia	0.8499
	Uayma	Selva baja caducifolia	0.8499
	Valladolid	Selva baja caducifolia	0.7999
	Yaxcabá	Selva baja caducifolia	0.7999
QUINTANA ROO	José María Morelos	Selva mediana caducifolia	0.8999
	Felipe Carrillo Puerto	Selva mediana caducifolia	0.8999
	Lázaro Cárdenas	Selva mediana caducifolia	0.8999
	Othon P. Blanco	Selva mediana caducifolia	0.8999
OAXACA	Solidaridad	Selva mediana caducifolia	0.8999
	Ixtlan	Selva alta perennifolia	0.625
	Juchitan	Selva alta perennifolia	0.625
	Mixe	Selva alta perennifolia	0.625

	San Andrés Yae	Selva baja caducifolia	0.525
	San Jerónimo Coatlán	Selva mediana subcaducifolia	0.7999
	San Juan Bautista Cuicatlán	Selva alta perennifolia	0.52
	San Juan Lachigalla	Selva baja caducifolia	0.525
	San Juan Lajarcia	Selva baja caducifolia	0.525
	San Juan Mixtepec-08	Selva baja caducifolia	0.525
	San Juan Petlapa	Selva baja caducifolia	1.525
	San Mateo del Mar	Selva baja espinosa-caducifolia	0.8499
	San Miguel Chimalapa	Selva alta perennifolia	0.625
	San Miguel Soyaltepec	Selva alta perennifolia	0.8499
	San Pablo Macuiltianguis	Selva baja caducifolia	0.525
	San Pedro Huamelula	Selva mediana caducifolia	0.725
	San Pedro Mixtepec- Distrito 22	Selva mediana subcaducifolia	0.7999
	San Pedro Tapanatepec	Selva baja espinosa-caducifolia	0.8499
	San Pedro Totolapa	Selva baja caducifolia	0.525
	Santa María Chimalapa	Selva alta perennifolia	0.625
	Santa María Jacatepec	Selva baja caducifolia	0.525
	Santiago Lachiguiri	Selva baja caducifolia	0.525
	Santiago Niltepec	Selva baja caducifolia	1.525
	Santo Domingo Petapa	Selva alta perennifolia	0.625
	Santo Domingo Tehuantepec	Selva baja espinosa caducifolia	0.8499
	Santo Domingo Zanatepec	Selva baja espinosa caducifolia	0.8499
	Tehuantepec	Selva baja espinosa caducifolia	0.8499
	Villa Alta	Selva baja caducifolia	0.525
CHIAPAS	Arriaga	Selva alta perennifolia	0.675
	Benemérito de las Américas	Selva alta perennifolia	0.525
	Chiapa de Corzo	Mesófilo de montaña	0.8499
	Chilón	Selva alta perennifolia	0.8999
	Jitotol	Selva alta perennifolia	0.8999
	La Concordia	Selva baja caducifolia	0.8999
	Mapastepec	Selva mediana subcaducifolia	0.8999
	Ocosingo	Selva alta perennifolia	0.675
	Ocozocautla de Espinosa	Selva alta perennifolia	0.8499
	Siltepec	Selva mediana subcaducifolia	0.525
	Tonalá	Selva alta perennifolia	0.675
	Tuxtla Gutiérrez	Selva baja caducifolia	0.8499
	Venustiano Carranza	Selva baja caducifolia	0.8499
	Acapulco de Juárez	Selva baja caducifolia	0.725
GUERRERO	Coyuca	Selva baja caducifolia	0.725
	Petatlán	Selva baja caducifolia	0.725
	San Marcos	Selva baja caducifolia	0.725
COLIMA	Colima	Selva mediana subcaducifolia	0.8499
	Comala	Selva mediana subcaducifolia	0.8499
	Isla Socorro	Selva mediana subcaducifolia	0.8499
	Manzanillo	Selva mediana subcaducifolia	0.8499
	Tecomán	Selva mediana subcaducifolia	0.8499
JALISCO	Cabo Corrientes	Selva mediana subcaducifolia	0.675
	Casimiro Castillo	Selva alta perennifolia	0.725
	Cuautitlán de García Barragán	Selva mediana subcaducifolia	0.725
	La Huerta	Selva baja caducifolia	0.725
	Pihuamo	Selva alta perennifolia	0.625
	Puerto Vallarta	Selva mediana subcaducifolia	0.675
	Tlajomulco de Zúñiga	Selva baja caducifolia	0.725
	Tomatlán	Selva mediana subcaducifolia	0.725
NAYARIT	Compostela	Selva alta perennifolia	0.575
	Huajicori	Selva alta perennifolia	0.575
	Tepic	Selva baja caducifolia	0.575
	Tuxpan	Selva baja caducifolia	0.575
SINALOA	Concordia	Selva baja caducifolia	0.675
	Culiacán	Selva baja caducifolia	0.575
	Mazatlán	Selva baja caducifolia	0.675

Para determinar el tamaño de muestra se utilizó el método de muestreo estratificado (Scheaffer *et al.*, 1987), con el siguiente procedimiento:

N = Total de colectas

Y = Número de colecta

P = Probabilidad

W_i = % de colectas por tipo de vegetación

N_i = Número de colectas por tipo de vegetación

B = Límite para el error de estimación

n(W_i) = Número de comunidades a muestrear en cada tipo de vegetación

$$\text{Media} = \bar{Y} = \Sigma P(Y) / \Sigma Y = [P(Y1) + P(Y2) + \dots P(Y106)] / 106$$

$$\text{Varianza} = s_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{n_i} P(Y)^2_{ij} - n_i \bar{Y}^2_i}{n_i - 1} \quad \text{estima a } \sigma_i^2$$

$$\text{Tamaño de muestra} = n = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{N_i^2 \sigma_i^2}{W_i}}{N^2 \frac{B^2}{4} + \sum_{i=1}^n N_i \sigma_i^2}$$

Total de Colectas N = 109

$$\text{Media} = \bar{Y} = 79.66 / 106 = 0.7516$$

Varianzas por tipo de vegetación:

$$\text{Bosque mesófilo de montaña} \quad s_1^2 = 0.0$$

$$\text{Selva alta perennifolia} \quad s_2^2 = 0.0146$$

$$\text{Selva mediana caducifolia} \quad s_3^2 = 0.0094$$

$$\text{Selva baja caducifolia} \quad s_4^2 = 0.0341$$

$$B = 0.037 \text{ unidades de la media poblacional} = 5 \%$$

El número y porcentaje de colectas calculado por tipo de vegetación se presenta en el cuadro 3.

Cuadro 3. Número y porcentaje de colectas por tipo de vegetación.

Tipo de Vegetación	Número de colectas por tipo de vegetación	% de colectas por tipo de vegetación
Bosque mesófilo de montaña	$N_1 = 1$	$W_1 = 1/106 = 0.0094$
Selva alta perennifolia	$N_2 = 22$	$W_2 = 22/106 = 0.2075$
Selva mediana caducifolia	$N_3 = 23$	$W_3 = 23/106 = 0.2169$
Selva baja caducifolia	$N_4 = 60$	$W_4 = 60/106 = 0.5660$

$$n = \frac{\frac{(1)^2(0.0)}{0.0094} + \frac{(22)^2(0.0146)}{0.2075} + \frac{(23)^2(0.0094)}{0.2169} + \frac{(60)^2(0.0341)}{0.5660}}{((106)^2(0.037^2/4)) + ((1)(0.0) + (22)(0.0146) + (23)(0.0094) + (60)(0.0341))}$$

$$= \frac{273.87}{6.4289} = 42.59 = 43$$

Número de comunidades a muestrear por cada tipo de vegetación = $n(W_i)$

Bosque mesófilo de montaña $nW_1 = 43 (0.0094) = 0.404 \approx 1$

Selva alta perennifolia $nW_2 = 43 (0.2075) = 8.92 \approx 9$

Selva mediana caducifolia $nW_3 = 43 (0.2169) = 9.32 \approx 9$

Selva baja caducifolia $nW_4 = 43 (0.5660) = 24.33 \approx 24$

5.3.3 Establecimiento de la ruta de colecta

Se propusieron tres regiones de colecta: sur, sureste y occidente de México, que incluyen once estados y 109 municipios (Cuadro 4). El antecedente para elegir estas regiones, es la probabilidad del 75 al 95 % de encontrar guayabo, que arrojó el estudio previo de distribución de la especie y los reportes de colectas de herbario en los municipios. La ruta de colecta seleccionada incluyó el sur de Veracruz y parte de Tabasco, Campeche, Yucatán y Chiapas, auxiliados por mapas de vías de comunicación (Palacios y Palacios, 2002).

Cuadro 4. Regiones, estados y número de municipios con probabilidad de encontrar guayabo y con reportes de colectas de herbario.

Región	Sureste	No.	Sur	No.	Occidente	No.
Estados	Tabasco	3	Oaxaca	29	Colima	5
	Campeche	8	Chiapas	14	Jalisco	8
	Yucatán	26	Guerrero	4	Nayarit	4
	Quintana Roo	5			Sinaloa	3
Total		42		47		20

5.3.4 Colecta y conservación de material vegetal

En total se realizaron 22 colecciones de material vegetal (vareta, hoja y fruto) (Cuadro 5). A fin de reunir la mayor variabilidad, los parámetros considerados fueron tamaño, forma de la hoja y fruto, color y grosor de pulpa, así como sanidad de la planta entre otras características. De cada árbol seleccionado se tomaron ramas sanas con tres a seis pares de hojas, incluyendo brotes tiernos. Se colocaron en una prensa botánica, entre hojas de papel periódico y cartón corrugado para lograr un proceso de deshidratación paulatino, por alrededor de 20 días con cambios de papel cada tercer día. Se digitalizaron las imágenes de cada ejemplar y posteriormente se separaron las hojas y brotes de los tallos y en conjunto se colocaron en sobres de papel que se mantuvieron en una bolsa de plástico negra, en un lugar seco, para su conservación. Respecto a los frutos, por lo prolongado del recorrido, en cuanto a tiempo y distancia, la mayoría de las mediciones se realizaron en campo para evitar problemas con la conservación y traslado de las muestras.

Cuadro 5. Procedencia de los genotipos de guayabo colectados en las provincias florísticas costa del golfo de México, serranías transísmicas y península de Yucatán.

No. de colecta	Lugar de procedencia	Provincia florística	Características	Tipo de vegetación	Coordenadas	Altitud m.s.n.m.	Tipo climático
E01	La Tinaja, Veracruz	Costa del Golfo de México	Fruto redondo, amarillo, con la pulpa amarilla	Selva mediana caducifolia	18°19'46.64"N 96°56'45.8"W	250	Aw2"
E02	Minatitlán, Veracruz	Costa del Golfo de México	Fruto redondo, amarillo, con la pulpa amarilla	Selva mediana caducifolia	17°58'0.72"N 94°31'54.6"W	6.7	Am
E03	Teapa, Tabasco	Costa del Golfo de México	Fruto aperado, amarillo con pulpa amarilla	Selva alta perennifolia	17°33'49.74"N 92°57'14.24"W	47.5	Af
E04	Teapa, Tabasco	Costa del Golfo de México	Fruto redondo, grande con pulpa blanca	Selva alta perennifolia	17°33'49.74"N 92°57'14.24"W	47.5	Af
E05	Teapa, Tabasco	Costa del Golfo de México	Fruto redondo, amarillo con la pulpa blanca	Selva alta perennifolia	17°33'49.74"N 92°57'14.24"W	47.5	Af
E06	Teapa, Tabasco	Costa del Golfo de México	Fruto redondo, firme, grande y con pulpa rosa	Selva alta perennifolia	17°33'49.74"N 92°57'14.24"W	47.5	Af
E07	Nuevo Progreso, Tabasco	Costa del Golfo de México	Fruto redondo, amarillo, costillona, con pulpa amarilla	Bajos inundables	18°36'53.85"N 92°11'48.22"W	0.3	Amw"
E08	Yotolín, Yucatán	Península de Yucatán	Fruto amarillo con pulpa blanca, muy firme y no se cae del árbol cuando maduran, buen aroma	Selva baja caducifolia	20°19'31.39"N 89°27'9.81"W	32.9	Aw1
E09	Dzan, Yucatán	Península de Yucatán	Fruto amarillo, con pulpa blanca, costillona, forma aperada y árbol con buena carga	Selva baja caducifolia	20°23'19.27"N 89°27'50.75"W	26.5	Aw1
E10	Dzan, Yucatán	Península de Yucatán	Fruto amarillo, forma aperada, con pulpa blanca y buen sabor	Selva baja caducifolia	20°23'19.27"N 89°27'50.75"W	26.5	Aw1
E11	Dzan, Yucatán	Península de Yucatán	Fruto redondo, con pulpa color rosa intenso	Selva baja caducifolia	20°23'19.27"N 89°27'50.75"W	26.5	Aw1
E12	Bolonchén, Campeche	Península de Yucatán	Fruto redondo, con pulpa amarilla	Selva mediana caducifolia	20°0'16.95"N 89°44'48.45"W	128.3	Aw0
E13	Bolonchén, Campeche	Península de Yucatán	Fruto grande, aperado y firme, blanco con pulpa blanca	Selva mediana caducifolia	20°0'16.95"N 89°44'48.45"W	128.3	Aw0

E14	Muna, Yucatán	Península de Yucatán	Fruto redondo, amarillo, con pulpa crema. No sobresale por el sabor	Selva baja caducifolia	20°29'4.33'' N 89°43'3.26'' W	23.8	Aw ₀
E15	Tenabo, Campeche	Península de Yucatán	Fruto aperado, muy grande con pulpa blanca	Selva mediana caducifolia	20° 2'19.51''N 90° 13'26.1''W	12.5	Aw ₀
E16	Vicente Guerrero, Campeche	Península de Yucatán	Fruto redondo, amarillo con pulpa amarilla, con buena firmeza y sabor	Selva baja caducifolia	19°13'12.59''N 90°43'49.01''W	19	Aw ₀
E17	Vicente Guerrero, Campeche	Península de Yucatán	Fruto grande, aperado, con buena firmeza y mucha pulpa color crema	Selva baja caducifolia	19°13'12.59''N 90°43'49.01''W	19	Aw ₀
E18	Vicente Guerrero, Campeche	Península de Yucatán	Fruto aperado chico, con buen sabor	Selva baja caducifolia	19°13'12.59''N 90°43'49.01''W	19	Aw ₀
E19	Palenque, Chiapas	Serranías Transísmicas	Fruto chapeado, con pulpa rosa, pequeño	Selva baja caducifolia	17°32'26.94''N 91°58'49.04''W	701	Am
E20	Xanil, Chiapas	Serranías Transísmicas	Fruto amarillo, redondo con pulpa blanca	Selva mediana caducifolia	17°15'29.4''N 91°58'49.04''W	796	Af
E21	Ocosingo, Chiapas	Serranías Transísmicas	Fruto redondo, con pulpa rosa	Selva mediana caducifolia	16°54'30.45''N 92°05'51.42''W	900.9	Am
E22	Ocosingo, Chiapas	Serranías Transísmicas	Fruto redondo, amarillo, costillona, con pulpa amarilla	Selva mediana caducifolia	16°54'30.45''N 92°05'51.42''W	900.9	Am

Colectores: José Luis Domínguez Álvarez & Esmeralda Cázares Sánchez,
2005.

De los genotipos de la colección de germoplasma ubicada en Tabasco, Zacatecas, se evaluaron 20 colectados en las provincias florísticas sierra madre oriental, serranías meridionales y altiplanicie en México y cuatro provenientes de Brasil (Cuadro 6).

Cuadro 6. Origen de los genotipos de guayabo de la colección de germoplasma ubicada en Tabasco, Zacatecas.

No. de colecta	Lugar de procedencia	Provincia florística	Características	Tipo de vegetación	Coordenadas	Altitud m.s.n.m.	Tipo climático
Z01	Pénjamo, Guanajuato	Altiplanicie		Matorrales y pastizales	20°25'30.16"N 101°43'13.36"W	1763	ACw ₀
Z02	Jungapeo, Michoacán	Serranías meridionales		Bosque tropical caducifolio	19°29'32.17"N 100°29'33.36"W	1499	ACw ₀
Z03	Laureles, Juárez, Michoacán	Serranías meridionales	Pera blanca	Bosque tropical caducifolio	19°18'41.78"N 100°26'02.41"W	1370	ACmw
Z04	Jungapeo, Michoacán	Serranías meridionales	Pulpa amarilla	Bosque tropical caducifolio	19°29'32.17"N 100°29'33.36"W	1499	ACw ₀
Z05	Pénjamo, Guanajuato	Altiplanicie	China rosada	Matorrales y pastizales	20°25'30.16"N 101°43'13.36"W	1763	ACw ₀
Z06	Molango, Hidalgo	Sierra Madre Oriental	Costillona	Bosque Mesófilo de Montaña	20°47'26.97"N 98°43'31.86"W	1649	Cw ₂
Z07	Laureles, Juárez, Michoacán	Serranías meridionales	Guaje	Bosque tropical caducifolio	19°18'41.78"N 100°26'02.41"W	1370	ACmw
Z08a	Jungapeo, Michoacán	Serranías meridionales	Epidermis chapeada	Bosque tropical caducifolio	19°29'32.17"N 100°29'33.36"W	1499	ACw ₀
Z08b	Jungapeo, Michoacán	Serranías meridionales		Bosque tropical caducifolio	19°29'32.17"N 100°29'33.36"W	1499	ACw ₀
Z09	Zicata, Juárez, Michoacán	Serranías meridionales	Pulpa crema, poca semilla	Bosque tropical caducifolio	19°18'41.78"N 100°26'02.41"W	1370	ACmw
Z10	Zicata, Juárez, Michoacán	Serranías meridionales	Pera chica, buena firmeza	Bosque tropical caducifolio	19°18'41.78"N 100°26'02.41"W	1370	ACmw
Z11	Zicata, Juárez, Michoacán	Serranías meridionales	Redonda sin picudo	Bosque tropical caducifolio	19°18'41.78"N 100°26'02.41"W	1370	ACmw
Z12a	Brasil		PM Roja				
Z12b	Brasil						
Z13	Brasil		SK lisa, grande				
Z14	Brasil		SK china				
Z15	Calvillo, Aguascalientes	Altiplanicie	Media China	Matorral subtropical	21°50'51.69"N 101°43'15.22"W	1626	Bs ₁ h
Z16	Jungapeo, Michoacán	Serranías meridionales		Bosque tropical caducifolio	19°29'32.17"N 100°29'33.36"W	1499	ACw ₀
Z17	Buenos Aires, "El Chique", Zacatecas	Altiplanicie	Selección roja, con picudo	Matorrales y pastizales	22°00'25.56"N 102°52'56.58"W	1600	Bs ₁ h
Z18	Cerro Colorado, Juárez, Michoacán	Serranías meridionales	Pera larga, sin picudo	Bosque tropical caducifolio	19°18'41.78"N 100°26'2.41"W	1370	ACmw

5.3.5 Caracterización morfológica

5.3.5.1 Obtención de la información sobre caracteres morfológicos

Las plantas se evaluaron con 20 descriptores cualitativos aceptados por la International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV, 1987) para *Psidium guajava* L. y se incluyó el color del tallo no considerado en estos descriptores (Cuadro 7).

Cuadro 7. Caracteres cualitativos evaluados en árbol, brote, hoja y fruto de guayabo.

Variable	Siglas	Categorías de medición
Posición de las ramas	PR	Erectas, Inclínadas, Extendidas
Color del brote	CB	Verde, Rojizo
Coloración por antocianinas	CA	Presente, Ausente
Intensidad	ICA	Débil, Media, Fuerte
Pubescencia	PSC	Ausente o muy escasa, Escasa, Media, Densa
Grosor del brote	GB	Delgado, Medio, Grueso
Forma de la hoja	FH	Ovada, Obovada, Trilobada, Oblongada, Oblonga
Curvatura en la sección de la cruz	CSC	Débil, Media, Fuerte
Torcimiento	TOR	Ausente, Presente
Curvatura del nervio central	CNC	Ausente, Presente
Grado de curvatura	GC	Débil, Medio, Fuerte
Ondulación del margen	OM	Ausente, Presente
Grado de ondulación	GO	Débil, Medio, Fuerte
Forma de la base de la hoja	FBH	Obtusa, Redondeada, Cordada
Forma de la punta de la hoja	FPH	Atenuada, Apiculada, Aguda, Obtusa, Redondeada
Forma del polo peduncular del fruto	FPP	Ampliamente redondeado, Redondeado, Truncado, Picudo, Con cuello
Forma del cuello en relación al resto del fruto	FC	Sin cuello, Angosto, Medio, Amplio
Diámetro de la cavidad del cáliz	DC	Pequeño, Medio, Grande
Collar rígido al redor de la cavidad del cáliz	CRC	Discreto, Llamativo
Espesor de la pulpa externa en relación al diámetro del corazón	EPE	Delgada, Media, Gruesa
Color del tallo	CT	Café claro, Café amarillento, Amarillo, Amarillo rojizo, Amarillo verdoso, Verde, Café verdoso, Café, Café obscuro, Café claro rojizo, Café rojizo, Rojizo

También se obtuvo información de nueve características cuantitativas en hoja y once en fruto (Cuadro 8). Para las mediciones se utilizaron imágenes digitalizadas de hojas, tallo y pecíolos (Figura 1) con un tamaño de muestra de seis y se analizaron con el paquete Image Tool, versión 3.0 (Wilcox *et al.*, 2002). Para los genotipos de la colección de germoplasma el tamaño de muestra fue de

10 frutos por árbol y para el resto de los genotipos dependió del estado fisiológico del árbol al momento de la recolecta.

Cuadro 8. Caracteres cuantitativos medidos en hoja, pecíolos y fruto.

Característica	Sigla	Unidad	Característica	Sigla	Unidad
Hoja			Fruto		
Área	AREA	cm ²	Peso del fruto completo	PFC	g
Perímetro	PER	cm	Grosor de pulpa	GP	mm
Longitud del eje mayor	LEJEMA	cm	Peso de la pulpa sin semillas	PPSS	g
Longitud del eje menor	LEJEM	cm	Peso semilla con mucílago	PSCM	g
Elongación	ELON	cm	Peso semilla sin mucílago	PSSM	g
Redondez	RDON	cm	Peso del mucílago	PM	g
Diámetro Feret	DFERT	cm	Peso de 100 semillas secas	PCS	g
Compactación	COMP	cm	Peso total de semillas secas	PTSS	g
Ángulo de inserción del tercer par de hojas	ANG	grados	Sólidos solubles del mucílago	SSM	°Bx
			Diámetro polar	DP	cm
			Diámetro ecuatorial	DE	cm
			Índice de forma del fruto = DP/DE	IND	=1 redondo >1 alargado <1 elíptico

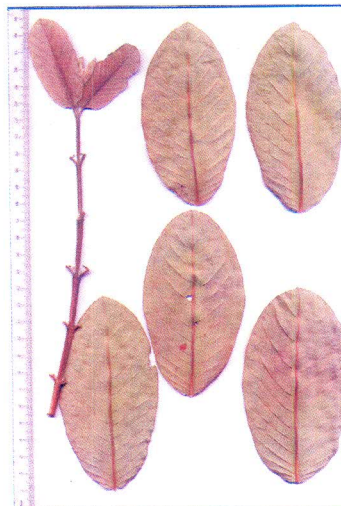


Figura 1. Imágenes digitalizadas de hojas, pecíolos y tallos de guayabo de donde se obtuvieron los datos cuantitativos.

5.3.6 Caracterización molecular

5.3.6.1 Extracción y purificación de ADN

La extracción del ADN se realizó a partir de los métodos propuestos por Ahrens y Seemüller (1992) y Lee *et al.*, (1993) con modificaciones. Se maceraron 0.5 g de tejido de hoja fresca en un mortero estéril con N líquido hasta obtener un polvo fino. Se agregaron 5.0 mL de MLO y la mezcla se repartió en tres tubos eppendorf que se mantuvieron en hielo hasta concluir con el resto de las muestras. Se agitaron con vortex para homogeneizar la mezcla, se centrifugaron por siete min a 14,000 rpm y se decantó el sobrenadante. Se adicionaron 800 µL de amortiguador CTAB y se mezcló perfectamente. Se Incubó a baño María a 60 °C durante dos horas. Se adicionó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) por tubo y se mezcló suavemente hasta lograr una apariencia lechosa. Posteriormente, se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min. Se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos y estériles con cuidado de no tomar partículas sólidas; se agregó un volumen de Isopropanol frío, se mezclaron suavemente e incubaron a -20 °C durante una hora. Se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min y se decantó el sobrenadante. Se dejó secar la pastilla en estufa a 37 °C por 30 min. Se agregaron 40 µL de agua para resuspender el ADN, a 37 °C por cinco min. Se centrifugó por tres segundos y se vaciaron los mismos ADN a un solo tubo. Se adicionaron 2 µL de ARNasa A (10 mg.mL⁻¹) y se incubaron a 37 °C durante dos horas. Posteriormente, se agregaron 60 µL de Acetato de Sodio 3M más 600 µL de Isopropanol frío. Se mezcló suavemente e incubó a -20 °C durante 1 hora. Se centrifugó a 14,000 rpm durante cinco min y se eliminó el sobrenadante. Se dejó secar la pastilla de ADN en estufa a 37 °C por 30 min y se resuspendió en 100 µL de agua a temperatura ambiente. Se guardó a -20 °C. La calidad del ADN se observó por medio de electroforesis en geles de agarosa 1 % y 85 volts y se cuantificó con un espectrofotómetro Bio-10 Perkin -Elmer® a 260 nm de λ.

5.3.6.2 Condiciones para PCR y obtención de patrones RAPD

En un tubo para PCR se colocaron 4 μL de ADN ($20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 13.45 μL H_2O Bidestilada estéril, 2.5 μL de Amortiguador PCR 10X, 2.0 μL de MgCl_2 50 mM, 1.0, dNTP's 2.5 mM, 2.0 μL de Oligonucleótido $10 \text{ pM} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 0.3 μL Taq ADN Polimerasa $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, lo que suma un volumen total de 25 μL de mezcla de reacción. La amplificación se llevo a cabo en un termociclador Gene mod. 2400 de Perkin-Elmer® con las siguientes condiciones: Pre-desnaturalizado a 94°C por 1 min; 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 35°C por 30 seg y a 72°C por 1:30 min y para finalizar un ciclo para extensión a 72°C durante 2:30 min. Se utilizaron 20 iniciadores de 10 pb de la serie B de Operon Technologies, Inc. Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa al 1.5 % en amortiguador TBE (EDTA 20 mM, Tris base, Ácido bórico, pH 8) por medio de electroforesis a 90 volts por dos horas. En cada gel se utilizó marcador de 1Kb para identificar el tamaño de las bandas. Se cargaron 5 μL de ADN y 3 μL de colorante naranja G por cada pozo. Los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio al 0.01 % en agua destilada estéril, por alrededor de 10 min y se observaron en un transiluminador UV (Gel Doc 2000, Bio-Rad).

5.3.7 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de correlación para eliminar las variables colineales y un análisis de agrupamiento con el método de Ward y la matriz de datos estandarizada. Para determinar la altura de corte en el dendrograma y generar los grupos, se utilizaron las Pseudoestadísticas T^2 y F, procedimiento que se confirmó con un análisis discriminante canónico. Con la información de los caracteres cualitativos se realizó un análisis de frecuencias relativas. Con los datos cuantitativos se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación. Los resultados se presentan por grupo. Se utilizó el paquete estadístico SAS versión 9.0 (2000).

A partir de los patrones de bandeo obtenidos se elaboró una matriz binaria asignando el valor 1 a la presencia y 0 a la ausencia de las bandas. Se elaboró una matriz de similitud con el coeficiente de Dice. El análisis de agrupamiento jerárquico se realizó con el método del promedio aritmético (UPGMA) con el paquete Ntsyspc, versión 2.2 (Adams *et al.*, 2004) y para evaluar su calidad se realizó la comparación entre la matriz de similaridad y la cofenética construida a partir de esta. Los grupos formados, se consideraron como poblaciones y se realizó un análisis para describir la estructura genética dentro y entre estas con el paquete Popgene versión 1.31 (Yeh *et al.*, 1999), que incluye el polimorfismo encontrado por grupo, frecuencias génicas, número de alelos observados y efectivos, coeficiente de diversidad genética de Nei e índice de Shannon, así como estadísticas de variación genética de los loci detectados en los 49 individuos tales como diversidad de genes en la población total, diversidad de genes dentro de subpoblaciones, coeficiente de diversidad de genes, flujo génico, coeficiente de diversidad genética de Nei, índice de Shannon, identidad y distancia genética de Nei y análisis de χ^2 de los locus encontrados considerando como alelo 1 a la ausencia y alelo 2 a la presencia de las bandas.

5.4 Resultados y discusión

5.4.1 Variabilidad genética encontrada a partir de caracteres morfológicos en las plantas de guayabo en estudio

Las variables morfológicas elegidas para el análisis de agrupamiento fueron: CT, PR, CB, CA, ICA, PSC, GB, FH, CSC, TOR, GC, GO, FBH, FPH, FPP, FC, DC, CRC, EPE, AREA, RDON, ANG, GP, PPSS, PSSM, PM, PCS, SSM, IND. Se formaron tres grupos de genotipos de acuerdo a la tendencia de la curva de las pseudoestadísticas F y T² que presentaron un cambio en el punto 3. Este valor indica el mejor número de grupos en el dendrograma, a una altura de corte de 0.065 r² conforme al análisis de agrupamiento jerárquico (Figuras 2 y 3).

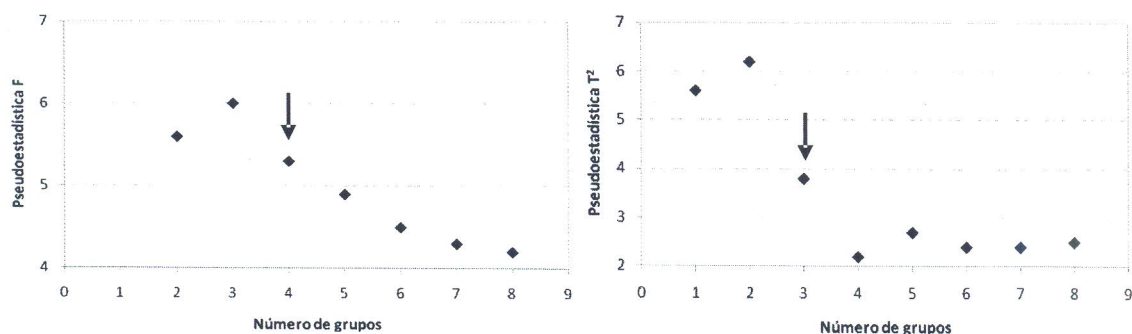


Figura 2. Número de grupos en el dendrograma en función de las Pseudoestadísticas F y T².

La mayoría de los genotipos que integran los grupos I y II proceden de la colección ubicada en Tabasco, Zacatecas. Los genotipos del grupo III provienen de la recolecta de la región sur-sureste (Figura 3).

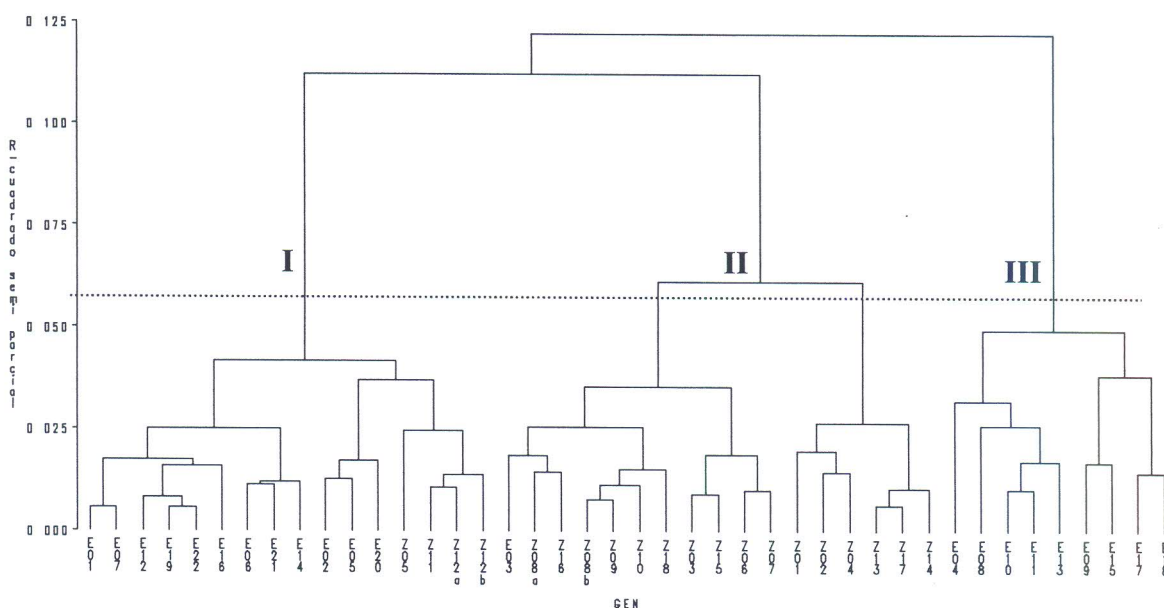


Figura 3. Diagrama de agrupamiento jerárquico de los genotipos en estudio con base en características morfológicas cualitativas y cuantitativas.

El grupo I está integrado por 18 genotipos: E01, E07, E12, E19, E22, E16, E06, E21, E14, E02, E05, E20, Z05, Z011, Z12a y Z12b. Las características cualitativas que lo distinguen son tallo principalmente verde, ramas inclinadas, brote verde y delgado, presencia de torcimiento en hojas, curvatura del nervio central débil, ondulación del margen débil, base de la hoja redondeada y punta obtusa, polo peduncular del fruto ampliamente redondeado, cuello angosto, llamativo collar rígido al rededor de la cavidad del cáliz y espesor de pulpa delgado (Cuadros 9 y 10). Respecto a las características cuantitativas tienen las hojas de menor tamaño. Frutos redondos con el menor tamaño, peso y grosor de pulpa, de dulzor intermedio, con la mayor cantidad de semillas pero pequeñas (Cuadros 11 y 12).

Cuadro 9. Características cualitativas evaluadas en tallo, rama, brote y hoja.

Característica	Grupo I	%	Grupo II	%	Grupo III	%
CT	Verde	50.0	Verde	29.4	Verde	44.4
PR	Inclinadas	43.8	Erecta	76.3	Inclinadas	44.4
CB	Brote verde	93.8	Rojizo	64.7	Brote verde	77.8
CA	Ausente	75.0	Presente	88.2	Ausente	77.8
ICA	Ausente	75.0	Débil	64.7	Ausente	77.8
PSC	Ausente a escasa	62.6	Densa	41.7	Ausente a escasa	62.6
GB	Delgado	62.5	Medio	47.1	Delgado	77.8
FH	Obovada	31.3	Obtrulada	52.9	Obovada	33.3
CSC	Débil	43.8	Débil	82.4	Media	55.6
TOR	Presente	62.5	Presente	64.7	Presente	55.6
CNC	Presente	87.5	Presente	70.6	Presente	55.6
GC	Débil	50.0	Débil	47.1	Medio	44.4
OM	Presente	75.9	Presente	64.7	Presente	55.6
GO	Débil	37.5	Débil	47.5	Medio	33.3
FBH	Redondeada	68.8	Obtusa	70.6	Redondeada	77.8
FPH	Obtusa	37.5	Atenuada	41.2	Obtusa	44.4

CT= Color del tallo; PR= Posición de las ramas; CB= Color del brote; CA= Coloración por antocianinas; ICA= Intensidad; PSC= Pubescencia; GB= Grosor del brote; FH= Forma de la hoja; CSC= Curvatura en la sección de la cruz; TOR= Torcimiento; CNC= Curvatura del nervio central; GC= Grado de curvatura; OM= Ondulación del margen; GO= Grado de ondulación; FBH= Forma de la base de la hoja; FPH= Forma de la punta de la hoja.

Cuadro 10. Características cualitativas evaluadas en fruto.

Característica	Grupo I	%	Grupo II	%	Grupo III	%
FPP	Ampliamente redondeado	75.0	Truncado	35.3	Ampliamente redondeado	33.3
					Redondeado	33.3
					Truncado	33.3
FC	Angosto	68.8	Amplio	35.3	Angosto	55.6
DC	Medio	87.5	Grande	52.9	Medio	55.6
CRC	Llamativo	93.8	Llamativo	64.7	Discreto	88.9
EPE	Delgada	43.8	Media	88.2	Gruesa	66.7

FPP= Forma del polo peduncular del fruto; FC= Forma del cuello en relación al resto del fruto; DC= Diámetro de la cavidad del cáliz; CRC= Collar rígido al rededor de la cavidad del cáliz; EPE= Espesor de la pulpa externa en relación al diámetro del corazón.

Cuadro 11. Valores de las características evaluadas en hoja de las plantas por grupo.

GRUPO		AREA	PER	LEJEMA	LEJEM	ELON	RDON	DFERT	COMP	ANG
I	MEDIA	36.31	28.11	10.52	4.70	2.26	0.58	6.73	0.65	42.68
	D.E.	6.81	2.33	1.22	0.56	0.30	0.06	0.65	0.05	9.51
	C.V.	0.19	0.08	0.12	0.12	0.13	0.10	0.10	0.08	0.22
II	MEDIA	41.25	28.40	11.15	5.09	2.25	0.63	7.16	0.64	43.37
	D.E.	10.50	3.82	1.51	0.79	0.29	0.06	0.95	0.05	7.76
	C.V.	0.25	0.13	0.14	0.16	0.13	0.10	0.13	0.08	0.18
III	MEDIA	41.33	29.74	10.77	5.08	2.16	0.59	7.18	0.67	44.41
	D.E.	11.57	5.10	1.66	0.74	0.31	0.09	1.03	0.05	8.44
	C.V.	0.28	0.17	0.15	0.15	0.14	0.15	0.14	0.08	0.19

D.E. = Desviación estándar; C.V.= Coeficiente de variación; AREA= Área; PER= Perímetro; LEJEMA= Longitud del eje mayor; LEJEM= Longitud del eje menor; ELON= Elongación; RDON= Redondez; DFERT= Diámetro Feret; COMP= Compactación; ANG= Ángulo de inserción del tercer par de hojas.

Cuadro 12. Valores de las características evaluadas en fruto y semillas por grupo.

GRUPO		PFC	GP	PPSS	PSCM	PSSM	PM	PCS	PTSS	SSM	DP	DE	IND
I	MEDIA	65.48	8.36	45.35	19.58	4.78	14.80	0.94	2.55	10.96	5.09	4.88	1.04
	D.E.	31.38	2.81	24.54	8.36	1.88	6.86	0.31	1.08	2.12	0.98	0.70	0.10
	C.V.	0.48	0.34	0.54	0.43	0.39	0.46	0.33	0.43	0.19	0.19	0.14	0.09
II	MEDIA	67.58	11.71	47.45	18.34	4.75	13.59	1.14	2.34	12.97	6.10	5.04	1.21
	D.E.	33.06	3.30	23.06	10.44	2.48	8.26	0.21	1.12	2.20	1.26	1.02	0.10
	C.V.	0.49	0.28	0.49	0.57	0.52	0.61	0.18	0.48	0.17	0.21	0.20	0.08
III	MEDIA	229.54	15.50	184.39	40.06	7.23	33.19	1.64	3.13	7.48	8.56	7.04	1.22
	D.E.	81.75	2.71	57.26	20.10	1.81	18.22	0.38	1.13	1.33	0.90	0.81	0.12
	C.V.	0.36	0.18	0.31	0.50	0.25	0.55	0.23	0.36	0.18	0.11	0.12	0.10

D.E. = Desviación estándar. C.V.= Coeficiente de variación; PFC= Peso del fruto completo; GP= Grosor de pulpa; PPSS= Peso de la pulpa sin semillas; PSCM= Peso semilla con mucílago; PSSM= Peso semilla sin mucílago; PM= Peso del mucílago; PCS= Peso de 100 semillas secas; PTSS= Peso total de semillas secas; SSM= Sólidos solubles del mucílago; DP= Diámetro polar; DE= Diámetro ecuatorial; IND= Índice de forma del fruto.

El grupo II está formado por 11 genotipos E03, Z08a, Z16, Z08b, Z09, Z10, Z18, Z03, Z15, Z06, Z07, Z01, Z02, Z04, Z13, Z17, Z14 con las características cualitativas sobresalientes de ramas erectas, brote rojizo de grosor medio, débil coloración por antocianinas, pubescencia densa, hoja obtrulada, curvatura en la sección de la cruz débil, presencia de torcimiento en la hoja, curvatura del nervio central débil, ondulación del margen débil, base de la hoja obtusa y punta atenuada, polo peduncular del fruto truncado, cuello amplio, cavidad del cáliz grande con llamativo collar rígido al rededor y espesor de la pulpa medio (Cuadros 9 y 10). Las características cuantitativas que distinguen a este grupo son hojas alargadas y redondeadas, frutos medianos y muy dulces, con forma aperada (alargada) y con semillas de tamaño intermedio entre los grupos I y III (Cuadros 11 y 12).

El grupo III lo integran 13 genotipos E04, E08, E06, E10, E11, E13, E09, E15, E17 y E18 y tienen como principales características cualitativas tallo principalmente verde, ramas inclinadas, brote verde y delgado, sin coloración

por antocianinas, presencia de torcimiento y curvatura del nervio central, curvatura en la sección de la cruz media, ondulación del margen media, base de la hoja redondeada y punta obtusa, cuello del fruto angosto, discreto collar rígido al rededor de la cavidad del cáliz y espesor de la pulpa grueso (Cuadros 9 y 10). Las principales características cuantitativas son hojas grandes y anchas con el ángulo de inserción más abierto, frutos más grandes y menos dulces, de forma aplanada con mucha pulpa y semillas grandes (Cuadros 11 y 12; Anexo 2).

En la mayoría de las características morfológicas cuantitativas tanto en hoja como en fruto, el grupo III presentó los mayores valores, el II los intermedios y el I los menores. Respecto a los coeficientes de variación, para los caracteres de hoja se encuentran entre el 8 y 28 % y los de fruto entre 8 y 57 %, lo que indica que existe una importante variabilidad entre los genotipos evaluados y que los caracteres cuantitativos de fruto son más variables que los de hoja (Cuadros 11 y 12, Figura 4; Anexo 1 y Anexo 2).

Con los resultados del análisis discriminante canónico se encontró que la primera función explica 79 % de la variabilidad de los datos; en tanto que la contribución de la segunda correspondió a 21 %; los valores propios fueron 31.9 y 8.4 respectivamente y los valores absolutos de la estructura canónica total oscilaron entre 0.002 y 0.875. En la representación gráfica de los individuos con base en las dos funciones discriminantes, es posible observar la separación entre los grupos encontrados con el análisis de conglomerados (Figura 4), lo que confirma que entre los tres grupos existen diferencias morfológicas importantes. Esta tendencia se respalda con los valores de la distancia de Mahalanobis que fueron altamente significativos ($P \leq 0.01$) entre todos los grupos, 139.5 entre I y II, 59.3 entre I y III y 127.8 entre II y III.

Las variables con mayor aportación a la primera función discriminante con signo positivo son color del brote, coloración por antocianinas, forma del polo peduncular y sólidos solubles del mucílago y con signo negativo forma de la base de la hoja, curvatura en la sección de la cruz y posición de ramas (Figura 4, Anexo 3).

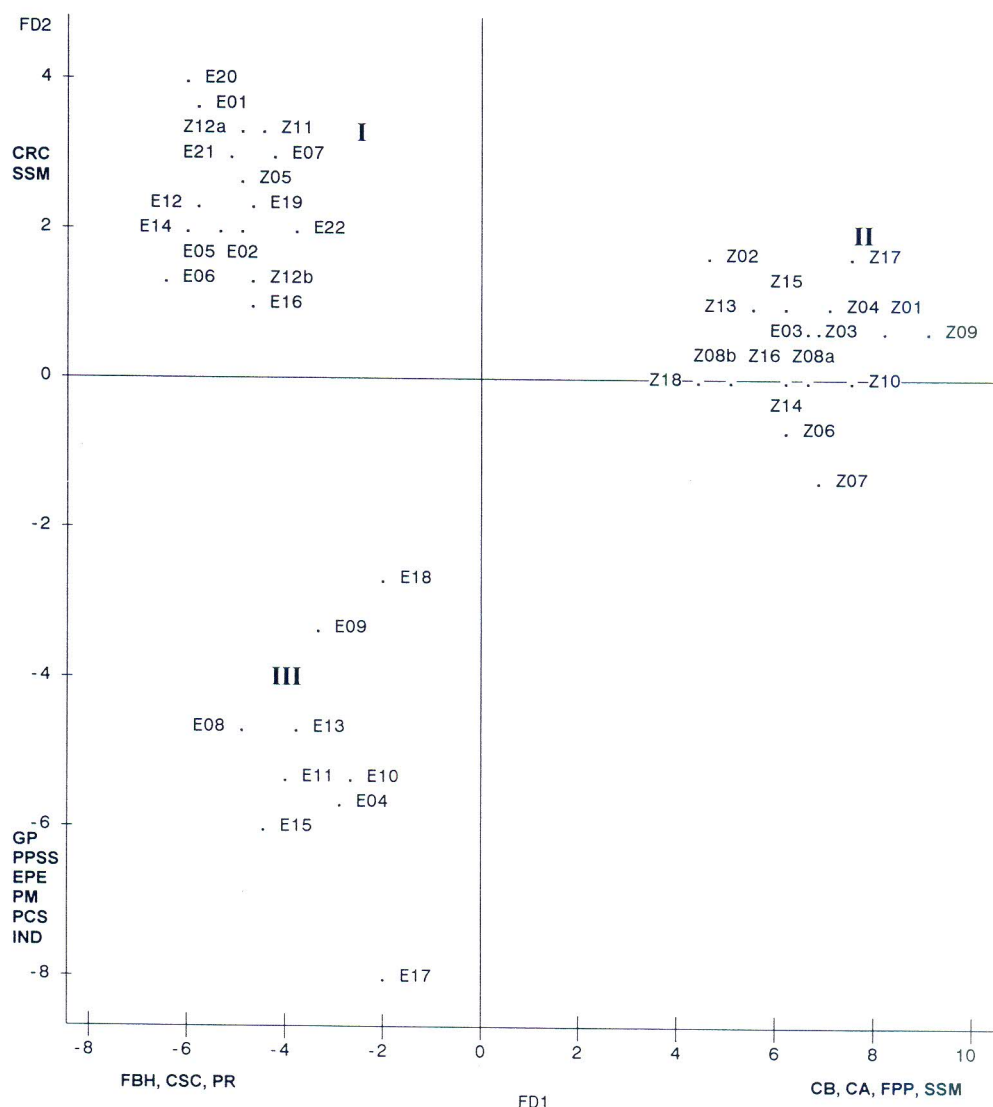


Figura 4. Representación gráfica de las dos primeras Funciones Discriminantes Canónicas. CB= Color del brote; CA= Coloración por antocianinas; FPP= Forma del polo peduncular del fruto; SSM= Sólidos solubles del mucílago; GP= Grosor de pulpa; PPSS= Peso de la pulpa sin semillas; EPE= Espesor de la pulpa externa en relación al diámetro del corazón; PM= Peso del mucílago; PCS= Peso de 100 semillas secas; IND= Índice de forma del fruto; CRC= Collar rígido al rededor de la cavidad del cáliz.

Para la segunda función discriminante con signo positivo fueron el collar rígido alrededor de la cavidad del cáliz y sólidos solubles del mucílago y con signo negativo grosor de pulpa, peso pulpa sin semillas, espesor de la pulpa externa en relación al diámetro del corazón, peso del mucílago, peso de cien semillas secas e índice de forma de fruto (Figura 4, Anexo 3). Estas características fueron distintivas y confirman la descripción realizada para cada grupo, por lo que se pueden considerar como descriptores de variabilidad en futuros trabajos.

Al igual que en este trabajo de investigación, en otros estudios realizados en guayabo, se ha encontrado variabilidad fenotípica principalmente con la evaluación de características morfológicas del fruto. Perales y Silguero (1995), encontraron variabilidad en la forma, color de la epidermis y contenido de sólidos solubles en cultivares evaluados en Zacatecas. Hernández *et al.* (2003), encontraron diferencias entre y dentro de cuatro huertas de guayabo de Calvillo, Aguascalientes en cuanto a colores de pulpa (crema, blanca, amarilla y rosa) y formas de fruto (ovalada y aperada). Padilla *et al.* (2006), observaron una gran variabilidad en cuanto a forma y tamaño del fruto, color de pulpa, número de semillas, grosor del casco, entre otras características, en una colecta de material silvestre, de traspatio y cultivado en 11 estados del país ubicados entre los 18° 49' y 22° 00' de latitud Norte y en un intervalo de altitud de 10 a 2000 msnm.

Es posible que la variación morfológica encontrada en los tres grupos de genotipos que se evaluaron en este trabajo, se pueda aprovechar en los programas de mejoramiento genético como el emprendido por el INIFAP. Para este fin, los criterios de selección del guayabo con base en el fruto incluyen peso adecuado a la demanda del mercado, pocas semillas y pulpa gruesa, color de pulpa blanco para consumo en fresco o rosa oscuro para la industria, sabor y

aroma característicos de guayaba fresca, sin sabor maderoso o amargo, con más del 10 % de sólidos solubles totales, con una acidez del 1.25 al 1.5 % para la industria y de 0.2 a 0.6 % para el consumo en fresco, contenido de vitamina C de 300 g·Kg⁻¹ o más, vida post-cosecha prolongada y resistencia a daño por insectos o enfermedades. Los criterios de selección en árboles incluyen que sean vigorosos, extendidos, de porte bajo, resistentes a plagas y enfermedades, de rendimiento elevado y sistema radicular pequeño (Nakasone y Paull, 1998).

La Norma Internacional para la Guayaba Codex Stan 215-1999 establece que el calibre requerido para su empaque y comercialización se determina por el peso o por el diámetro ecuatorial del fruto (Anexo 4). De acuerdo con esta norma, los genotipos de los grupos I y II se clasifican en el calibre 7 con un peso de 61 a 100 g y un diámetro entre 43 a 53 mm y los del III en el calibre 4 con un peso de 201-250 g y 76-85 mm de diámetro, por lo que podrían generarse variedades o selecciones con características para la exportación.

En México, para la comercialización en fresco de este fruto, se aplica la Norma Mexicana NMX-FF-040-SCFI-2002 con énfasis en los tipos China y Media China. Los criterios de clasificación se basan en la calidad y el tamaño del fruto en tres categorías: extra, primera y segunda. Respecto al tamaño los calibres se determinan por el diámetro ecuatorial, A $\geq$ 5 cm, B de 4.0-4.9 cm, C de 3.0-3.9 cm y D < de 2.9 cm. Los genotipos de los grupos I y II podrían generar variedades o selecciones para el consumo nacional en fresco, ya que se ubican en el rango de tamaño aceptable para competir en el mercado (B y A respectivamente), así como un contenido de sólidos solubles totales superior al 10 %. En los tres grupos los frutos presentan varios colores de pulpa y formas, lo que se puede aprovechar para atraer la atención de los consumidores.

Los genotipos del grupo III, corresponden a los frutos más grandes que tendrían dificultades para posicionarse en el mercado nacional para el consumo en fresco, pero que si pueden ser aprovechados por la industria. Su contenido de sólidos solubles totales es menor al 10 % pero destaca el grosor de la pulpa, característica que ayuda a tener mejores rendimientos en los procesos de industrialización.

5.4.2 Variabilidad genética encontrada en las plantas de guayabo en estudio, mediante marcadores moleculares

De los productos amplificados con los 20 iniciadores RAPD, se obtuvieron un total de 255 bandas donde la mayoría mostraron polimorfismos (88 % en promedio) principalmente con los iniciadores OPB02-5,9,11,18 y 19 (Cuadro 13, Figura 5).

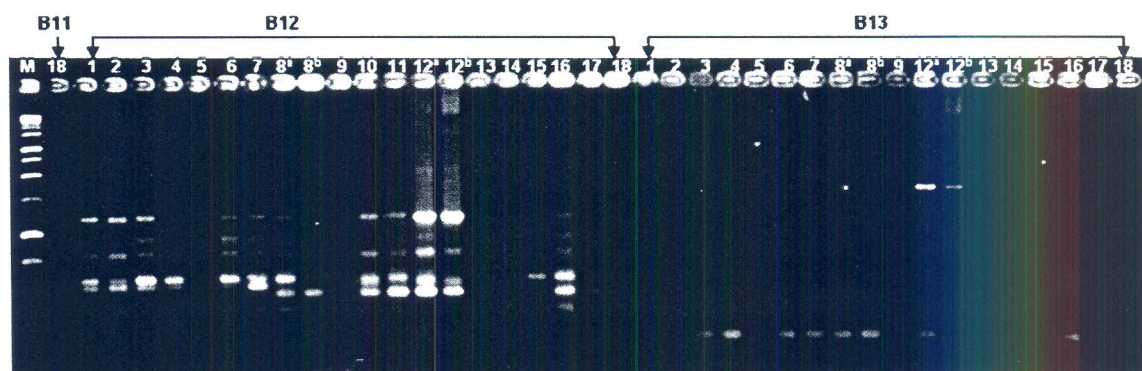


Figura 5. Polimorfismos observados con los patrones de bandeo de RAPD en las plantas de guayabo en estudio.

Cuadro 13. Características de los oligonucleótidos utilizados para la obtención de los patrones de bandeo y polimorfismo encontrado.

Oligonucleótido	Secuencia	Productos amplificados	Tamaño pb	Polimorfismo (%)
OPB01	5'-GTT TCG CTC C-3'	21	300-10000	90
OPB02	5'-TGA TCC CTG G-3'	5	350-875	100
OPB03	5'-CAT CCC CCT G-3'	4	220-1400	100
OPB04	5'-GGA CTG GAG T-3'	16	100-2500	100
OPB05	5'-TGC GCC CTT C-3'	9	375-2000	100
OPB06	5'-TGC TCT GCC C-3'	16	100-2900	50
OPB07	5'-GGT GAC GCA G-3'	11	250-1400	82
OPB08	5'-GTC CAC ACG G-3'	14	260-3700	79
OPB09	5'-TGG GGG ACT C-3'	5	100-400	100
OPB10	5'-CTG CTG GGA C-3'	15	200-1600	87
OPB11	5'-GTA GAC CCG T-3'	13	200-2000	100
OPB12	5'-CCT TGA CGC A-3'	11	250-1250	91
OPB13	5'-TTC CCC CGC T-3'	16	200-2000	94
OPB14	5'-TCC GCT CGT G-3'	13	250-2000	92
OPB15	5'-GGA GGG TGT T-3'	16	250-2900	75
OPB16	5'-TTT GCC CGG A-3'	9	300-2000	56
OPB17	5'-AGG GAA CGA G-3'	16	100-2000	81
OPB18	5'-CCA CAG CAG T-3'	17	250-2500	100
OPB19	5'-ACC CCC GAA G-3'	16	200-2500	100
OPB20	5'-GGA CCC TTA C-3'	12	100-1000	83
Total		255	Promedio	88

El polimorfismo es un cambio localizado en una secuencia específica de ADN dentro de un genoma originado por deleciones, inversiones, inserciones o rearrreglos que son mutaciones que generan diferentes alelos para un locus específico, por lo que puede indicar variación (Valadez y Kahl, 2000). En algunos trabajos realizados en guayabo con marcadores RAPD, se reportan valores de polimorfismo del 60 al 96 % y se observa la tendencia de que a menor polimorfismo es mayor la similitud entre los genotipos (Tapia, 2006, Domínguez-Álvarez *et al.*, 2005, Padilla *et al.*, 2002).

En el dendrograma derivado del análisis de agrupamiento jerárquico es posible observar seis grupos y tres individuos aislados (coeficiente de similitud >0.35). Para fines de análisis y dado que los tres individuos se agrupan a una distancia de 0.22 se consideraron como un séptimo grupo. Se puede considerar a

estos valores de similitud como relativamente bajos lo que indica una importante variabilidad entre los genotipos evaluados.

El grupo I está formado por 14 genotipos: E1, E6, E7, E12, E15, E17, E18, E16, E19, E21, E5, E10, E11 y E2, en su mayoría colectados en un intervalo de altitud entre los 0.3 y 47 metros sobre el nivel del mar, con vegetación de selva baja caducifolia y algunos colectados entre los 128 y 900 m, 16° 54' y 20° 23' de latitud N, 89° 27' y 92° 57' de longitud W, con vegetación de selva mediana caducifolia, en las provincias florísticas de la costa del golfo de México, península de Yucatán y serranías transísmicas.

El grupo II corresponde a cinco genotipos: E3, E8, E4, E13 y E14, colectados en un intervalo de altitud entre los 23 y 128 m, 17° 33' y 20° 29' de latitud N, 89° 27' y 92° 57' de longitud W, con vegetación de selva baja y mediana caducifolias y alta perennifolia de las provincias florísticas de la costa del golfo de México y península de Yucatán.

En el grupo III se encuentran 14 genotipos: Z12a, Z12b, Z1, Z3, Z2, Z8a, Z8b, Z4, Z6, Z7, Z10, Z11, Z15 y Z16, la mayoría provienen de las provincias florísticas serranías meridionales, altiplanicie y sierra madre oriental, de sitios con un intervalo de altitud de los 1300 a los 1700 m y entre los 19° 18' y 21° 50' de latitud N, 98° 43' y 101° 43' de longitud W, con vegetación característica del bosque tropical caducifolio así como pastizales y matorrales. En este grupo también se observan dos ejemplares de Brasil.

El grupo IV lo integran siete genotipos: V1, V2, V3, V4, V5, V6 y V7, colectados en las provincias florísticas costa del golfo de México, sierra madre oriental y serranías meridionales, en un intervalo de altitud de los 76 a los 1470 m y entre los 19° 13' y 21° 31' de latitud N, 96° 51' y 98° 43' de longitud W, en

zonas propias para el desarrollo de selva mediana caducifolia, selva alta perennifolia y bosque mesófilo de montaña.

El grupo V está compuesto por los genotipos E9 y E22 procedentes de la península de Yucatán a 26 m de altitud, 20° 23' de latitud N y 89° 27' de longitud W, con selva baja y de las serranías transísmicas a 900 m y 16° 54' de latitud N y 92° 05' de longitud W, con selva mediana.

El grupo VI lo forman los genotipos Z13, Z14, Z17 y Z18, colectados en la altiplanicie y serranías meridionales entre los 1370 y 1600 m de altitud y 19° 18' y 22° 00' de latitud N, 100° 26' y 102° 52' de longitud W y dos procedentes de Brasil.

Por último, el grupo VII lo integran los genotipos E20, Z5 y Z9 colectados en las provincias florísticas serranías transísmicas, altiplanicie y serranías meridionales con un intervalo de altitud de los 1370 a 1800 m y entre los 17° 15' y 20° 25' de latitud N, 91° 58' y 101° 43' de longitud W (Cuadros 5 y 6; Figura 6).

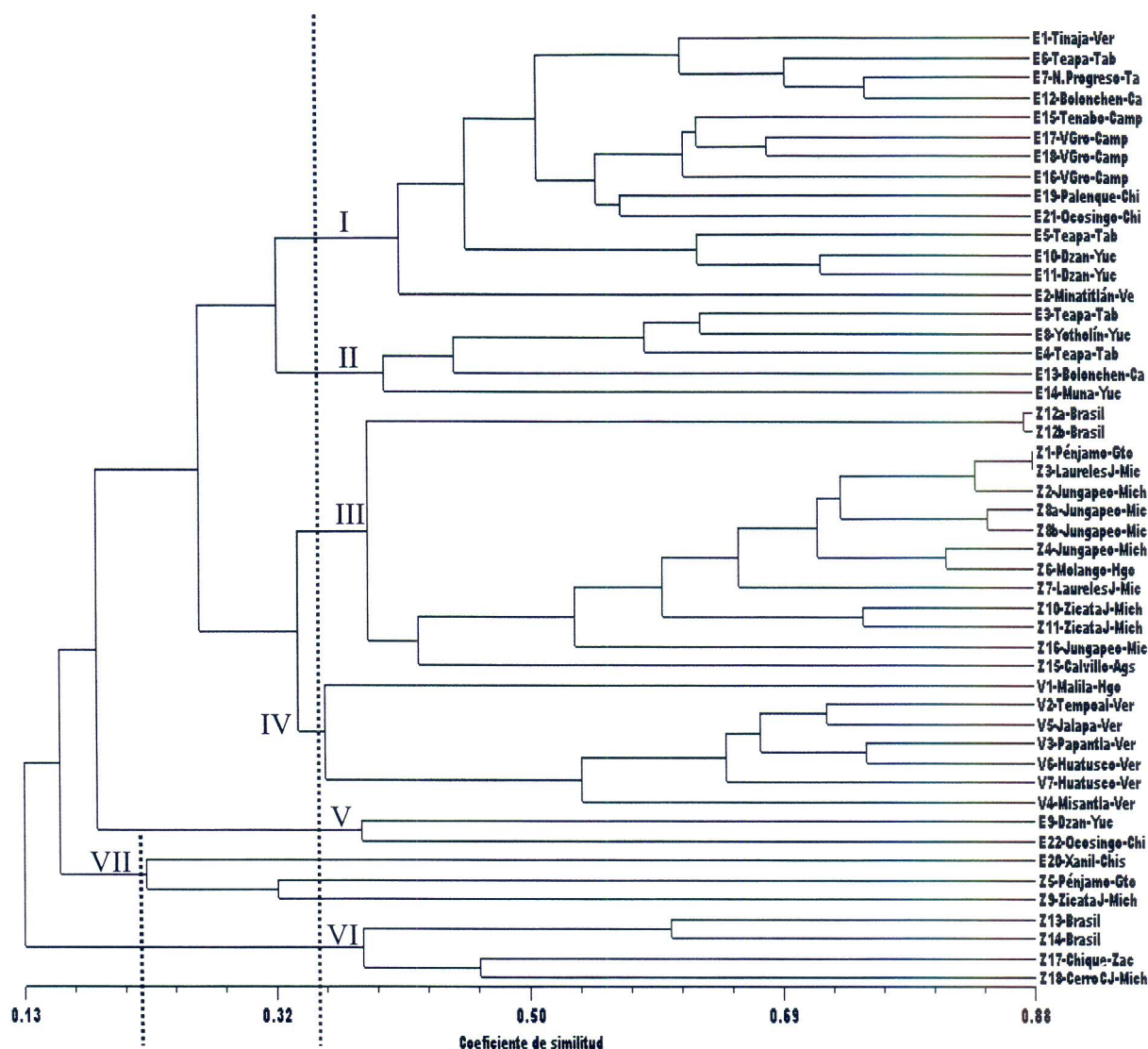


Figura 6. Agrupamiento de las 49 plantas de guayabo en función de los marcadores RAPD.

Los valores mayores para el número de alelos observados y efectivos así como el coeficiente de diversidad genética de Nei e índice Shannon los registran los grupos I y III lo que sugiere mayor variabilidad entre los genotipos dentro de los grupos. Los valores menores corresponden a los grupos V, VI y VII lo que indica menor variabilidad. Los grupos II y IV presentan valores intermedios (Figura 7).

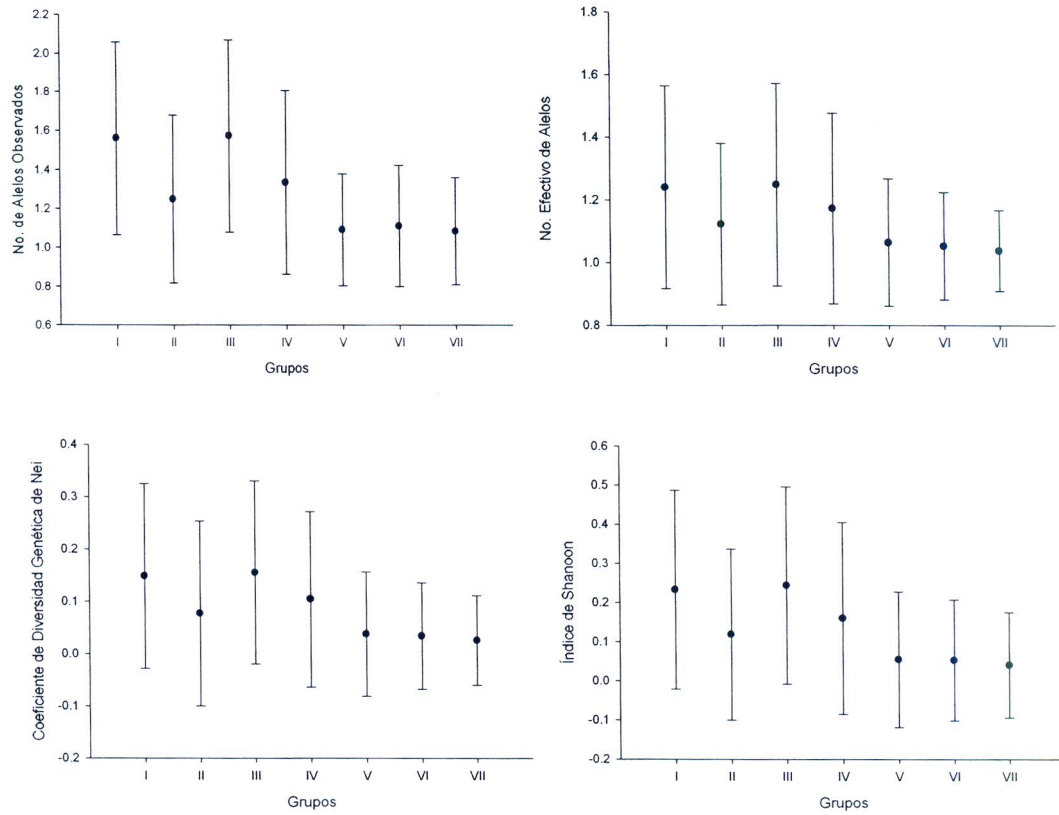


Figura 7. Valores medios y desviación estándar del número de alelos observados y efectivos e índices de diversidad por grupo.

Al considerar las 49 plantas de guayabo en estudio como una población y los grupos observados como subpoblaciones se encontró que en general la diversidad es baja, así lo indican los valores del coeficiente de diversidad genética de Nei (0.16), el índice de Shannon (0.27), la diversidad de genes en la población total en función de la heterocigocidad (0.13), diversidad de genes dentro de subpoblaciones (0.08), coeficiente de diversidad de genes (0.36) y el flujo génico (0.86). La variabilidad encontrada con los genotipos evaluados contrasta con la baja diversidad observada, posiblemente porque se trata de la misma especie (Cuadro 14).

Los alelos más frecuentes en el total de los individuos (con los mayores valores de probabilidad) de acuerdo a las estadísticas de variación genética, corresponden a bandas encontradas principalmente con los iniciadores B1, B11, B12, B13, B14, B17, B19 y B20 (Cuadro 14).

Cuadro 14. Valores mayores de las estadísticas de variación genética de los loci detectados en 49 individuos de guayabo.

	Media	Desviación estándar	Valores mayores p	Locus
Coeficiente de diversidad genética de Nei	0.1633	0.1410	0.4908-0.4991	B11-8 B15-13,14 B14-13
Índice de Shannon	0.2749	0.2006	0.6839-0.6922	B11-8 B14-13 B15-13,14
Variabilidad de genes en la población total (H_t)	0.1307	0.0151	0.4104-0.4888	B1-17 B11-8 B14-13 B15-13,14 B17-13,16 B20-8
Variabilidad de genes dentro de subpoblaciones (H_s)	0.0829	0.0049	0.2504-0.3060	B1-17,18 B13-15 B17-12
Coeficiente de diversidad de genes (G_{st})	0.3662		0.8035-0.8986	B12-5,6 B17-9,15
Flujo génico	0.8653		18.5435	B15-10 B19-1

En cuanto a la similitud de los grupos en estudio, con base en los valores de distancia genética de Nei, los grupos I y II son similares a una distancia de 1.56 mientras que los grupos V, VI y VII a 1.72. Los grupos III y IV son similares a 0.32 (Figura 8).

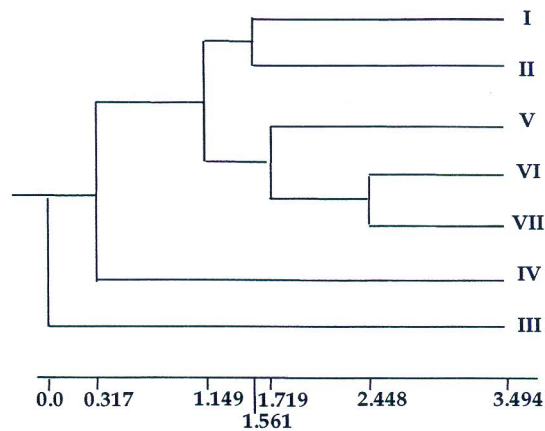


Figura 8. Dendrograma con base en la distancia genética de Nei y el método UPGMA.

Con el análisis de la estructura de las poblaciones por locus se encontró que el 25.9 % de los alelos no están en equilibrio, es decir no presentan un patrón de herencia neutro (3:1), lo que significa que la posibilidad de heredarse a las siguientes generaciones es reducida y corresponden a bandas generadas por 18 de los 20 iniciadores probados (Cuadro 15). Esto podría estar relacionado con la variabilidad observada entre y dentro de los grupos formados y el número limitado de genotipos que los integran, de tal manera que no es posible considerarlos como poblaciones y mucho menos en equilibrio H-W.

Cuadro 15. Alelos que no están en equilibrio por iniciador.

Iniciador	Locus	Iniciador	Locus
B1	17	B11	3,8,9
B4	6,9,10,16	B12	1,4,5,6,8,10,11
B5	1,8,9	B13	6,7,8,9,11,13,14,16
B6	15	B14	12,13
B7	5	B15	7,9,12,13,14
B8	6,7,9,10,11,12,13,14	B17	7,8,9,13,15,16
B9	3,5	B19	8,10,11,12
B10	4,5,7,12,13,14,15	B20	4,8,11,12

Al observar los porcentajes por grupo de bandas presentes que comparten los individuos en estudio, el grupo I coincide en un 2.74 %, el II en 4.70 %, el III en 3.92 %, el IV en 6.27 %, el V en 2.74, el VI en 1.56 % y el VII en 1.18 %. Aunque estos valores relativos son muy bajos, lo anterior sugiere que los genotipos del grupo VI son más parecidos entre sí en comparación con los grupos restantes.

Los resultados de la evaluación de los genotipos respecto a sus patrones de ADN, indican que la variabilidad en general es importante y respecto a esta, se observó la tendencia de agrupamiento en relación a las provincias florísticas donde se recolectaron, de tal manera que los materiales más variables provienen de la costa del Golfo de México, serranías transísmicas y península de Yucatán, los menos variables provienen de ambientes más específicos, un grupo de la serranías transísmicas y península de Yucatán, otro de las serranías meridionales y altiplanicie y uno más de serranías meridionales, altiplanicie y serranías transísmicas. Los grupos con variabilidad intermedia incluyen materiales recolectados en la costa del golfo de México, sierra madre oriental y serranías meridionales. En un estudio previo, realizado con marcadores RAPD, Tapia (2006), observó agrupamientos respecto al lugar de origen en genotipos de guayabo provenientes de Nayarit, Chiapas, Morelos, Zacatecas, Michoacán, Tamaulipas, Veracruz y Brasil.

Padilla *et al.* (2002) encontraron en doce accesiones seleccionadas por su potencial productivo una variabilidad genotípica reducida y por el contrario, Hernández *et al.* (2003), encontraron una amplia variabilidad genética en árboles de guayabo dentro y entre plantaciones de Calvillo, Aguascalientes, al igual que Domínguez (2004), en genotipos de guayabo 'Media china' provenientes de plantaciones de los municipios de Juárez y Zitácuaro Michoacán.

En tejocote (*Crataegus* spp.), Núñez-Colín *et al.* (2008b), evaluaron morfológicamente accesiones provenientes de tres regiones de los estados de Chiapas, Puebla y México y encontraron diferencias importantes en los materiales procedentes de Chiapas al contrario de los provenientes de Puebla y México que fueron considerados como parte de un mismo pool genético. Las variables más discriminantes fueron de hoja: ángulo basal, longitud del peciolo sobre la longitud del eje principal, longitud del eje menor sobre la longitud del eje principal y el número de nervaduras.

Al integrar los grupos con base en los patrones RAPD, se observa una gran variación en cuanto a formas y tamaños de los frutos, que contrasta con los grupos formados a partir de los caracteres morfológicos. Se ha establecido que el fenotipo de un individuo obedece al genotipo, más el ambiente, más el efecto de la interacción de las plantas con su medio ambiente (interacción genotipo-ambiente), lo que permite un proceso continuo de adaptación y evolución (Hidalgo, 2003; Stansfield, 1992). También es probable que factores externos como la selección humana influyan para que la variación morfológica antropológicamente útil se conserve, de tal manera que las características morfológicas observadas en los genotipos evaluados son el producto de un conjunto de factores que se interrelacionan de manera compleja.

5.5 Conclusiones

La descripción de la variabilidad de las 49 colectas de guayabo con base en 40 características morfológicas y 20 iniciadores RAPD permitió identificar tres grupos morfológicos y seis moleculares.

Las características morfológicas contrastantes fueron la forma, peso y tamaño del fruto, grosor de pulpa, contenido de sólidos solubles y cantidad de semilla principalmente. En el grupo I, los frutos son redondos con el menor tamaño, peso y grosor de pulpa, de dulzor intermedio y con muchas semillas pequeñas. En el grupo II, los frutos son medianos y muy dulces, alargados y con semillas medianas. En el grupo III, los frutos son grandes, menos dulces, alargados con mucha pulpa y semillas grandes.

Estos grupos pueden servir de base para un mejoramiento planeado de la especie que derive en la generación de líneas con características específicas para el consumo en fresco o para la industria alimentaria diferentes a las que se comercializan en la actualidad y que podrían ser atractivas para los productores en campo.

Los genotipos más variables respecto a sus patrones de ADN, provienen de la costa del golfo de México, serranías transísmicas y península de Yucatán, los menos variables de ambientes específicos de las serranías transísmicas, península de Yucatán, serranías meridionales y altiplanicie y los de variabilidad intermedia de la costa del golfo de México, sierra madre oriental y serranías meridionales. Esta información puede ser de utilidad para la ubicación de futuros sitios de recolecta para fines de mejoramiento genético o para la conservación de colecciones o bancos de germoplasma de la especie.

VI. VARIABILIDAD GENÉTICA SEGÚN RAPD Y SU RELACIÓN CON DEFICIENCIAS DE MICRONUTRIMENTOS EN PLANTAS DE GUAYABO

(*Psidium guajava* L.)

GENETIC VARIABILITY BY RAPD AND ITS RELATION WITH DEFICIENCIES OF MICRONUTRIMENTS IN GUAVA PLANTS (*Psidium guajava* L.)

Esmeralda Cázares Sánchez¹, Sergio D. Segura Ledesma², José Luis Domínguez Álvarez³, César Del C. Luna Morales¹, Joel Pineda Pineda⁵ y Reyna I. Rojas Martínez⁴

Universidad Autónoma Chapingo: ¹Instituto de Horticultura, ²Centro Regional Universitario Centro Occidente, ³Centro Regional Universitario Anáhuac, ⁵Departamento de Suelos. Colegio de Postgraduados: ⁴Programa de Fitosanidad.

6.1 Resumen

En este estudio, se evaluó la variabilidad genética en cuatro genotipos de guayabo con marcadores RAPD y su relación con deficiencias nutrimentales de B, Cu, Fe, Mn y Zn. Los resultados de la variabilidad morfológica indican que los tipos Oaxaca y San Cristóbal fueron más parecidos entre sí y Media china tuvo mayor afinidad con Sassaoka. La

Abstract

This study includes the evaluation of four guava genotypes with respect to genetic variability, the effect of nutritional deficiencies of B, Cu, Fe, Mn and Zn and the relationship of symptoms with RAPD markers. The results indicate that the morphological variability Oaxaca and San Cristóbal types were more similar among themselves and Media china had a

variación respecto a las huellas de ADN fue baja entre el total de los individuos evaluados (0.11). Dentro de los tipos Media China y San Cristóbal fueron los más variables (0.13) y Oaxaca el más uniforme (0.06). Los efectos de los tratamientos sobre los caracteres morfológicos cuantitativos de las plantas no fueron estadísticamente diferentes, aunque se manifestaron sus síntomas característicos. Se identificaron tres bandas que se relacionan con la presencia de los síntomas de deficiencias de micronutrientes: B1-5 de aproximadamente 3000 pb relacionada con las deficiencias de Fe en una frecuencia del 100 % y Zn en 75 %; la banda B1-7 de 2000 pb con la deficiencias de Fe en un 100 %, B en 75 %, Cu en 75 %, Mn en 66.6 % y Zn en 83.3 % y la banda B1-13 de 1070 pb se asoció con las deficiencias de Fe en una frecuencia del 100 %, Mn en 91.6 % y Zn 75 %. Esta asociación sugiere complejidad en cuanto al número de genes que pudiera estar involucrados para que se manifiesten los síntomas de deficiencias de micronutrientes.

Palabras clave: Fe, Cu, B, Mn, Zn, marcadores moleculares RAPD.

greater affinity with Sassaoka. The variation in DNA fingerprints was low among the total number of individuals evaluated (0.11). Within types Media china and San Cristóbal were more variable (0.13) and Oaxaca the most uniform (0.06). The effects of processing on the quantitative morphological characteristics of plants were not significant, although their symptoms were expressed. Was identified two DNA bands are related to the presence of symptoms of micronutrient deficiencies: B1-5 with a size of approximately 3000 pb with the deficiencies of Fe at a frequency of 100 % and Zn in 75 %; B1-7 of 2000 pb with Fe at a frequency of 100 %, B 75 %, Cu 75 %, Mn 66.6 % and Zn 83.3 % and the B1-13 band of 1070 pb with the deficiencies of Fe at a frequency of 100 %, Mn 91.6 % and Zn 75 %. This association suggests complexity in the number of genes that might be involved to manifest symptoms of micronutrient deficiencies.

Key words: Fe, Cu, B, Mn, Zn, RAPD molecular markers.

6.2 Introducción

A finales del siglo XVIII, De Sature, fue uno de los pioneros en el análisis de los elementos en las plantas y sugirió el término elemento esencial para su crecimiento. S. Sprengel estableció que el suelo puede ser improductivo para la agricultura si carece de un elemento esencial. A mediados del siglo XIX, Justus von Liebig, retoma la Ley del mínimo y J. Sachs, demuestra que las plantas

podían crecer y desarrollarse en soluciones nutritivas totalmente carentes de suelo, sentando las bases de la hidroponía. A finales del siglo XIX, se incrementó de manera importante el uso de fertilizantes principalmente en Europa, para mejorar la productividad de los cultivos. En 1934 Arnon y Stout, postularon tres criterios para considerar a un elemento como esencial: a) Una planta será incapaz de completar su ciclo vital en ausencia del elemento mineral considerado, b) La función que realice dicho elemento no podrá ser desempeñada por otro mineral de reemplazo o de sustitución, c) El elemento deberá estar directamente implicado en el metabolismo (*v.g.* componente de una molécula esencial) o requerirse en una fase metabólica precisa (*v.g.* reacción enzimática) (Azcón-Bieto y Talón, 2003).

Se ha establecido la necesidad de 17 elementos minerales para las plantas superiores aunque el níquel, sodio y silicio sólo se requieran por algunas especies (Cuadro 1).

Cuadro 1. Elementos esenciales en las plantas, formas de absorción y concentraciones consideradas adecuadas.

Elemento	Forma de absorción	$\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$
Oxígeno	O_2 , H_2O	30,000.0
Carbono	CO_2	40,000.0
Hidrógeno	H_2O	60,000.0
Nitrógeno	NO_3^- , NH_4^+	1,000.0
Fósforo	H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}	60.0
Potasio	K^+	250.0
Calcio	Ca^{2+}	125.0
Magnesio	Mg^{2+}	80.0
Azufre	SO_4^{2-}	30.0
Cloro	Cl^-	3.0
Boro	H_3BO_3	2.0
Hierro	Fe^{3+} , Fe^{2+}	2.0
Manganeso	Mn^{2+}	1.0
Cinc	Zn^{2+}	0.3
Cobre	Cu^+ , Cu^{2+}	0.1
Níquel	Ni^{2+}	~0.001
Molibdeno	MoO_4^{2-}	0.001

Fuente: Azcón-Bieto y Talón (2003).

vermiculita que no aportan nutrientes adicionales a las plantas y que cumplen con la función de soporte físico (Azcón-Bieto y Talón, 2003).

6.2.1 Función y síntomas de la deficiencia de los micronutrientes en estudio

A menudo, los síntomas de deficiencia nutrimental se observan en casos extremos cuando el ritmo de crecimiento y la producción disminuyen significativamente y por el contrario, las alteraciones ligeras son difíciles de detectar, posiblemente por la capacidad de adaptación de las plantas a los ambientes restrictivos ya que algunas ajustan su crecimiento al nutriente limitante, y no desarrollan síntomas visibles (Gárete y Bonilla, 2000). De manera general, a continuación se describen la función y síntomas de deficiencia de los elementos en estudio.

6.2.1.1 Boro

Este elemento se encuentra en un 95 % en las paredes celulares. Su papel es principalmente estructural ya que establece enlaces éster con los grupos cis-dioles para proporcionar estabilidad a la pared celular. También está relacionado con procesos de división y crecimiento celular, germinación, regulación hormonal y en la síntesis del uracilo como precursor del ARN. Su deficiencia libera a la 6-P-gluconato deshidrogenasa lo que induce la vía de las pentosas sobre la glucólisis, lo que ocasiona la acumulación de compuestos fenólicos extremadamente tóxicos para la raíz y los tallos, además se presenta un incremento en los niveles de auxinas. Los síntomas visuales son la inhibición del crecimiento y desarrollo de raíces primarias y secundarias. Cesa la división celular en tallos y hojas jóvenes, seguido de la necrosis y muerte de los meristemas, hojas con márgenes encorvados, entrenudos cortos y se estimula el alargamiento del tubo polínico y la germinación del polen (Azcón-Bieto y Talón, 2003).

cloroplastos y en catalizar los fenoles a lignina en la pared celular. La ferredoxina actúa como transmisor de electrones en procesos metabólicos como la fotosíntesis y reducción del N_2 y las lipoxigenasas catalizan la peroxidación del ácido linoléico a linolénico. La deficiencia de hierro en hojas inhibe el desarrollo de los cloroplastos y en raíces la elongación y el incremento del diámetro de los ápices radicales, pero aumenta la formación de raíces aéreas (Marschner, 2002).

6.2.1.4 Manganese

Se encuentra presente en el suelo en forma de óxidos y cuando se reducen a la forma Mn^{2+} se absorben por las raíces. Su deficiencia se manifiesta como clorosis entre las nervaduras con pequeñas manchas necróticas, por un desorden en la organización de las membranas del tilacoide, núcleo y mitocondrias. Forma parte del complejo manganeso-proteína que transporta los electrones desde el agua hasta el fotosistema II, así como de la Mn-superóxido dismutasa (isoenzima de la SOD), presente en mitocondrias, peroxisomas y ocasionalmente en cloroplastos, que participa en la defensa de las plantas contra radicales superóxido O_2^- . También, el Mn funciona como activador de enzimas respiratorias carboxilasas y deshidrogenasas del ciclo de krebs, de la arginasa del ciclo de la urea y la enzima málica dependiente de NAD en plantas C_4 . Puede ser reemplazado por el Mg^{2+} , pero a la vez compite por suplir la deficiencia de Fe (Azcón-Bieto y Talón, 2003).

6.2.1.5 Zinc

El Zn se absorbe como catión divalente (Zn^{2+}), forma parte de la estructura de por lo menos 80 sistemas enzimáticos, tales como la NADH y alcohol-deshidrogenasas, las cinco anhidrasas carbónicas que aceleran la hidratación reversible del dióxido de carbono a bicarbonato en la fotosíntesis. Junto con el Cu forman parte de algunos tipos de enzimas superóxido dismutasas en el

citoplasma y organelos de la célula vegetal, que participan en la defensa contra radicales superóxido. Es precursor del triptofano, el cual es indispensable para la producción del ácido indolacético en las hojas que tiene un efecto directo sobre la elongación de los tejidos. También el Zn participa en la estabilidad del ribosoma y está presente en la RNA polimerasa por lo que se puede considerar como regulador de la expresión génica. Los síntomas visibles de su deficiencia son clorosis intervenal, disminución en el crecimiento de las hojas jóvenes principalmente y acortamiento en la longitud de los entrenudos por una reducción en la concentración de auxinas. En extremo puede presentarse la muerte regresiva de las ramas más afectadas (Azcón-Bieto y Talón, 2003).

6.2.2 Características genéticas y su relación con la nutrición de las plantas

La interacción de las plantas con su medio ambiente (interacción genotipo-ambiente), permite un proceso continuo de adaptación y evolución. La variabilidad genética, que es almacenada en el genoma se expresa en características visibles o fenotipo y en procesos o productos internos a los que llaman genotipo (Hidalgo, 2003). Las condiciones de tolerancia a un determinado estrés nutricional (salinidad, alcalinidad, toxicidad o deficiencia) unidas a los requerimientos específicos de elementos esenciales en las plantas, se encuentran bajo control genético. En este sentido, en la naturaleza se pueden tener plantas ineficientes y eficientes para la asimilación de uno o más nutrientes. Es posible que las plantas eficientes se desarrollen en ambientes restrictivos gracias a la adaptación obtenida mediante la selección natural; de esta manera en plantas cultivadas de interés agrícola se han obtenido variedades resistentes mediante la selección dirigida (Azcón-Bieto y Talón, 2003).

Al respecto, se han propuesto algunos mecanismos para explicar las variaciones genéticas que justifican este comportamiento en las plantas dentro de las que se encuentran la modificación de la absorción radicular por cambios

en la morfología de la raíz o del mecanismo de absorción y transporte de iones, la alteración del movimiento de los nutrientes a través de las raíces, de su liberación al xilema y de la distribución de los nutrientes en la parte aérea, cambios en la utilización de nutrientes en el metabolismo y el crecimiento y la capacidad de sustituir un elemento por otro, sin embargo, este uno de los campos de investigación que más necesita la generación de conocimientos y nuevas tecnologías (Azcón-Bieto y Talón, 2003).

En los seres vivos, existen caracteres llamados marcadores cuyo patrón de herencia se puede seguir a nivel morfológico (características morfológicas), bioquímico (isoenzimas) o a nivel de ADN (marcadores moleculares). El uso de marcadores moleculares constituye una herramienta eficaz para la caracterización de germoplasma principalmente en la identificación de genotipos duplicados dentro de una colección, en la determinación del patrón genético o genotipos (huellas genómicas), en el análisis de la variabilidad genética de una colección y en el establecimiento de colecciones núcleo (Hidalgo, 2003).

Una de las técnicas utilizadas para el conocimiento de la información genética de las plantas es la amplificación al azar de ADN polimórfico (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD), capaz de detectar polimorfismos en la secuencia de los nucleótidos amplificados del ADN molde, con un solo iniciador constituido por una secuencia arbitraria de 10 pb compuesta en su mayoría por guanina y citosina (50-80 %). Los productos se separan fácilmente sobre geles de agarosa por medio de electroforesis y se pueden visualizar con iluminación ultravioleta. Es una técnica rápida, simple, eficiente, requiere de poca cantidad de ADN (10 ng por reacción) y se ha probado que detecta altos niveles de polimorfismo (Williams *et al.*, 1990; Waugh y Powell, 1992).

Recientemente en México, en plantas de guayabo Media China Domínguez *et al.*, (2005) observaron los efectos de deficiencias de N, P, K, Ca, Mg, S y Fe, mediante variables morfológicas y establecieron su asociación con marcadores moleculares RAPD. Encontraron que el 96 % de 49 loci evaluados fueron polimórficos lo que indicó que existía variabilidad genética dentro de la cual se identificaron plantas sin síntomas asociadas a tres loci con frecuencias específicas y plantas con síntomas asociadas a un loci, por lo que se consideró a estos marcadores como una herramienta eficaz para la detección de genotipos resistentes a estrés nutrimental. En otros países, se reportan algunos trabajos sobre las concentraciones normales, síntomas visibles de deficiencias nutrimentales en algunas variedades de guayabo con fines de diagnóstico y corrección (Manica, 2000; Gonzaga y Monteiro, 1994).

El presente trabajo forma parte del proyecto general “Manejo integrado de la guayaba (*Psidium guajava* L.)”, de la Universidad Autónoma Chapingo cuyos objetivos fueron la colecta, caracterización morfológica y molecular del guayabo en 24 estados de la República Mexicana para la obtención de selecciones y variedades, estudios de nutrición y la implementación de prácticas culturales acordes con el medio ambiente para la mejora del rendimiento del cultivo. En particular, la finalidad de esta investigación fue identificar la variabilidad genética y el efecto de deficiencias de micronutrientes en las plantas de cuatro tipos de guayabo. De manera específica, identificar la variabilidad genética mediante descriptores morfológicos y marcadores moleculares en plantas de guayabo ‘Media China’, Sassaoka, Oaxaca y San Cristóbal, provenientes de semilla y cultivadas bajo condiciones de invernadero; así como evaluar el efecto de deficiencias de Fe, Cu, Zn, Mn y B y su relación con marcadores moleculares en las plantas de guayabo en estudio.

Cuadro 4. Caracteres cualitativos evaluados en árbol, brote y hoja.

Variable	Siglas	Categorías de medición
Posición de las ramas	PR	Erectas, Inclínadas, Extendidas
Color del brote	CB	Verde, Verde rojizo, Rojizo
Coloración por antocianinas	CA	Presente, Ausente
Intensidad	ICA	Débil, Media, Fuerte
Pubescencia	PSC	Ausente o muy escasa, Escasa, Media
Grosor del brote	GB	Delgado, Medio, Grueso
Forma de la hoja	FH	Ovada, Obovada, Trulada, Obtrulada, Oblonga
Curvatura en la sección de la cruz	CSC	Débil, Media, Fuerte
Torcimiento	TOR	Ausente, Presente
Curvatura del nervio central	CNC	Presente, Ausente
Grado de curvatura	GC	Débil, Medio, Fuerte
Ondulación del margen	OM	Ausente, Presente
Grado de ondulación	GO	Medio, Débil
Forma de la base de la hoja	FBH	Obtusa, Redondeada
Forma de la punta de la hoja	FPH	Atenuada, Apiculada
Color del tallo	CT	Café, Verde, Café verdoso

A partir de imágenes digitalizadas por cada planta se midieron nueve caracteres cuantitativos en hoja (Cuadro 5) con el paquete Image Tool, versión 3.0 (Wilcox *et al.*, 2002). Adicionalmente, se incluyó la información generada con la evaluación de 20 caracteres cuantitativos en la planta en el transcurso del experimento de nutrición (Cuadro 8).

Cuadro 5. Caracteres cuantitativos medidos en hoja.

Variable	Siglas	Escala de medición
Área	AREA	cm ²
Perímetro	PER	cm
Longitud del eje mayor	LEJEMA	cm
Longitud del eje menor	LEJEM	cm
Elongación	ELON	cm
Redondez	RDON	cm
Diámetro Feret	DFERT	cm
Compactación	COMP	cm
Ángulo de inserción del tercer par de hojas	ANG	Grados

6.3.4 Caracterización molecular

6.3.4.1 Extracción y purificación de ADN

La extracción del ADN se realizó a partir de los métodos propuestos por Ahrens y Seemüller (1992) y Lee *et al.*, (1993) con modificaciones. Se maceraron 0.5 g de tejido de hoja fresca en un mortero estéril con N líquido hasta obtener

un polvo fino. Se agregaron 5.0 mL de MLO y la mezcla se repartió en tres tubos eppendorf que se mantuvieron en hielo hasta concluir con el resto de las muestras. Se agitaron con vortex para homogeneizar la mezcla, se centrifugaron por siete minutos a 14,000 rpm y se decantó el sobrenadante. Se adicionaron 800 μ L de amortiguador CTAB y se mezcló perfectamente. Se Incubó a baño María a 60 °C durante dos horas. Se adicionó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) por tubo y se mezcló suavemente hasta lograr una apariencia lechosa. Posteriormente, se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos y estériles con cuidado de no tomar partículas sólidas; se agregó un volumen de Isopropanol frío, se mezclaron suavemente e incubaron a -20 °C durante 1 hora. Se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min y se decantó el sobrenadante. Se dejó secar la pastilla en estufa a 37 °C por 30 min. Se agregaron 40 μ L de agua para resuspender el ADN, a 37 °C por cinco min. Se centrifugó por tres segundos y se vaciaron los mismos ADN a un solo tubo. Se adicionaron 2 μ L de ARNasa A (10 mg.mL⁻¹) y se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Posteriormente, se agregaron 60 μ L de Acetato de Sodio 3M más 600 μ L de Isopropanol frío. Se mezcló suavemente e incubó a -20 °C durante una hora. Se centrifugó a 14,000 rpm durante cinco min y se eliminó el sobrenadante. Se dejó secar la pastilla de ADN en estufa a 37 °C por 30 min y se resuspendió en 100 μ L de agua a temperatura ambiente. Se guardó a -20 °C. La calidad del ADN se observó por medio de electroforesis en geles de agarosa 1 % y 85 volts y se cuantificó con un espectrofotómetro Bio-10 Perkin -Elmer® a 260 nm de λ .

6.3.4.2 Condiciones para PCR y obtención de patrones RAPD

En un tubo para PCR se colocaron 4 μ L de ADN (20 ng. μ L⁻¹), 13.45 μ L H₂O Bidestilada estéril, 2.5 μ L de Amortiguador PCR 10X, 2.0 μ L de MgCl₂ 50 mM, 1.0, dNTP's 2.5 Mm, 2.0 μ L de Oligonucleótido 10 pM/ μ L, 0.3 μ L Taq ADN Polimerasa 5 U. μ L⁻¹, lo que suma un volumen total de 25 μ L de mezcla de

reacción. La amplificación se llevo a cabo en un termociclador Gene mod. 2400 de Perkin-Elmer® con las siguientes condiciones: Pre-desnaturalizado a 94 °C por 1 min; 35 ciclos a 94 °C por 30 seg, 35 °C por 30 seg y a 72 °C por 1:30 min y para finalizar un ciclo para extensión a 72 °C durante 2:30 min. Se utilizaron 20 iniciadores de 10 pb de la serie B de Operon Technologies, Inc. Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa al 1.5 % en amortiguador TBE (EDTA 20 mM, Tris base, Ácido bórico, pH 8) por medio de electroforesis a 90 volts por dos horas. En cada gel se utilizó marcador de 1Kb para identificar el tamaño de las bandas. Se cargaron 5 µL de ADN y 3 µL de colorante naranja G por cada pozo. Los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio al 0.01 % en agua destilada estéril, por alrededor de 10 min y se observaron en un transiluminador UV (Gel Doc 2000, Bio-Rad).

6.3.5 Inducción de deficiencias nutrimentales

Las plantas de guayabo de una altura aproximada de 30 cm fueron trasplantadas a macetas con arena sílica de 20 a 30 mallas y se colocaron sobre un plato. Previamente, la arena sílica fue tratada con ácido sulfúrico para eliminar los residuos de materia orgánica. La solución nutritiva, se depositó en un recipiente perforado con capacidad de 150 mL colocado a los costados del tallo (Cuadro 6) y se cubrió la superficie de las macetas con plástico transparente para evitar la contaminación con polvo o partículas de suelo.

Cuadro 6. Solución nutritiva utilizada para inducir deficiencias de micronutrientes en las plantas de guayabo.

Tratamiento	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Mn	B	Cu	Zn	Mo
	(mg L ⁻¹)											
Testigo*	210	31	234	160	48	64	2.5	0.5	0.5	0.02	0.85	0.02
Deficiente en Fe	210	31	234	160	48	64	0.0	0.5	0.5	0.02	0.85	0.02
Deficiente en Mn	210	31	234	160	48	64	2.5	0.0	0.5	0.02	0.85	0.02
Deficiente en B	210	31	234	160	48	64	2.5	0.5	0.0	0.02	0.85	0.02
Deficiente en Cu	210	31	234	160	48	64	2.5	0.5	0.5	0.0	0.85	0.02
Deficiente en Zn	210	31	234	160	48	64	2.5	0.5	0.5	0.02	0.0	0.02

*Hogland y Arnon (1938) modificada por Domínguez (2004) para guayabo.

Por alrededor de 18 meses, estas plantas se mantuvieron con 150 mL de solución nutritiva completa diariamente con la finalidad de incrementar su tamaño y formación del follaje. Durante los siguientes cinco meses se sometieron a deficiencias nutrimentales de Fe, Zn, Cu, Mn, y B, para lo cual se modificó la solución nutritiva eliminando el micronutriente correspondiente a cada tratamiento. Las soluciones nutritivas se prepararon con compuestos químicos con grado reactivo analítico así como agua destilada en recipientes individuales de plástico con tapa y capacidad de 50 L. Se trabajó con un diseño experimental completamente al azar, con tres repeticiones por tratamiento incluyendo igual número de testigos. Las fuentes de nutrimentos utilizadas para preparar la solución nutritiva durante el experimento incluyeron los siguientes compuestos: KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , H_2SO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , KOH , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Las deficiencias nutrimentales se identificaron con la evaluación visual de las hojas que presentaron síntomas asociados a los elementos en cuestión y se registró por cada planta la presencia de estos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Síntomas visuales para diagnosticar deficiencias nutricionales en plantas.

Parte de la planta	Síntoma predominante	Elemento deficiente
Hojas maduras y viejas	Clorosis	Uniforme $\rightarrow$ N, S
		Intervenal o manchas $\rightarrow$ Mg, Mn
		Punta y margen secos $\rightarrow$ K
	Necrosis	chamuscados $\rightarrow$
		Intervenal $\rightarrow$ Mg, Mn
Hojas jóvenes y ápices	Clorosis	Uniforme $\rightarrow$ Fe, S
		Intervenal o manchas $\rightarrow$ Zn, Mn
	Necrosis	$\rightarrow$ Ca, B, Cu
		$\rightarrow$ Mo, Zn, B
	Deformaciones	

Fuente: Marschner, 2002.

En el transcurso del experimento, se obtuvo información sobre 20 características cuantitativas medidas en diferentes partes de la planta; específicamente, para la obtención del ángulo del extremo terminal del ápice radical y el diámetro de éste, se utilizaron imágenes digitalizadas que se analizaron con el paquete Image Tool, versión 3.0 (Wilcox *et al.*, 2002) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Características cuantitativas medidas en la planta.

Variable	Siglas	Escala de medición
Área foliar	AF	cm ²
Peso fresco de hojas	PFH	g
Peso seco de hojas	PSH	g
Peso fresco de tallo	PFT	g
Peso seco de tallo	PST	g
Longitud de hojas del último entrenudo	LHUE	mm
Diámetro de rama al tercer par de hojas	DR3ph	mm
Peso fresco de raíz	PFR	g
Peso seco de raíz	PSR	g
Número de ápices radicales	NAR	número
Peso seco de ápices radicales	PSAR	g
Ángulo del extremo terminal del ápice radical	AAR	Grados
Diámetro del ápice radical	DAR	cm
Altura de la planta	AP	cm
Incremento en altura	IA	cm
Incremento en diámetro del tallo	IDT	mm
Incremento en altura a la primera rama	IAPR	cm
Incremento en diámetro de la primera rama	IDPR	mm
Índice de biomasa fresca	IBF	Adimensional
Índice de biomasa seca	IBS	Adimensional

Al inicio, durante y al concluir el experimento, se hicieron análisis de tejido vegetal para determinar la cantidad de los compuestos en estudio presentes en las hojas además de N, P, K y C. Para ello, se tomaron muestras de 20g de hojas ubicadas alrededor del tercer par, contadas del ápice hacía la base de la rama, ya que algunos autores consideran esta zona como la de mayor estabilidad de los nutrimentos en la planta (Sydney, 1986). Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio Central Universitario, del Departamento de Suelos, en la Universidad Autónoma Chapingo.

6.3.6 Relación de los síntomas de deficiencias de micronutrientos con marcadores moleculares

Para encontrar la asociación de las bandas con las deficiencias, se realizó un análisis de correspondencia por iniciador con los tratamientos por tipo así como análisis de frecuencias relativas con los 71 individuos, los cuatro tipos y los cinco tratamientos deficientes, con base en los grupos observados en los dendrogramas correspondientes, para los cuales se identificaron las bandas comunes entre los individuos que los conforman. En el caso del dendrograma general, los individuos se analizaron en función de los grupos formados en este y posteriormente se identificaron, dentro de cada grupo, los individuos sometidos al mismo tratamiento para detectar las bandas comunes. Sólo se consideraron los subgrupos con un mínimo de tres individuos. En el análisis por tratamiento, se consideró como mínimo que la banda estuviera presente en nueve individuos excepto para el manganeso que fue de ocho.

6.3.7 Análisis estadístico

Respecto a la caracterización morfológica, con la finalidad de eliminar las variables colineales, se realizó un análisis de correlación y se hizo un análisis de agrupamiento con el método de Ward y la matriz de datos estandarizada. Para determinar la altura de corte en el dendrograma y generar los grupos se utilizaron las Pseudoestadísticas T^2 y F , confirmándose con un análisis discriminante canónico. Con la información sobre características cualitativas se realizó un análisis de frecuencias relativas y con las cuantitativas se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación. Los resultados se presentan por grupo. Se utilizó el paquete estadístico SAS versión 9.0 (2000).

Para la caracterización molecular, a partir de los patrones de bandeo obtenidos se elaboró una matriz binaria asignando el valor 1 a la presencia y 0 a la ausencia de las bandas. Se elaboró una matriz de similitud con el coeficiente

de Dice. El análisis de agrupamiento jerárquico se realizó con el método del promedio aritmético (UPGMA) con el paquete Ntsyspc, versión 2.2 (Adams *et al.*, 2004) y para evaluar su calidad se realizó la comparación entre la matriz de similaridad y la cofenética construida a partir de esta. Adicionalmente, se realizó un análisis para describir la estructura genética dentro y entre las poblaciones en estudio con el paquete Popgene versión 1.31 (Yeh *et al.*, 1999), que incluye el polimorfismo encontrado por tipo, frecuencias génicas, número de alelos observados y efectivos, coeficiente de diversidad genética de Nei e índice de Shannon, así como estadísticas de variación genética de los loci detectados en los 71 individuos tales como coeficiente de diversidad genética de Nei, índice de Shannon, Heterocigocidad en sentido amplio, Heterocigocidad en sentido estricto, Varianza genética, Flujo génico, valores de Identidad y distancia genética de Nei y análisis de χ^2 de los locus encontrados considerando como alelo 1 a la ausencia y alelo 2 a la presencia de las bandas.

Para establecer los efectos de los síntomas de deficiencias de micronutrientes en las plantas con la información obtenida con las variables evaluadas se realizaron análisis de varianza y comparación de medias, coeficiente de variación y discriminante canónico. Adicionalmente se documentaron mediante fotografías los síntomas presentes de las deficiencias nutrimentales y se obtuvieron los valores medios de contenidos de micronutrientes obtenidos mediante los análisis de tejido vegetal.

Respecto a la relación de los síntomas de deficiencias de micronutrientes con marcadores moleculares, se analizó la formación de grupos en torno a las deficiencias con base en los dendrogramas derivados de la caracterización molecular para las 71 plantas y los cuatro tipos en estudio. También se realizaron análisis de correspondencias y frecuencias relativas.

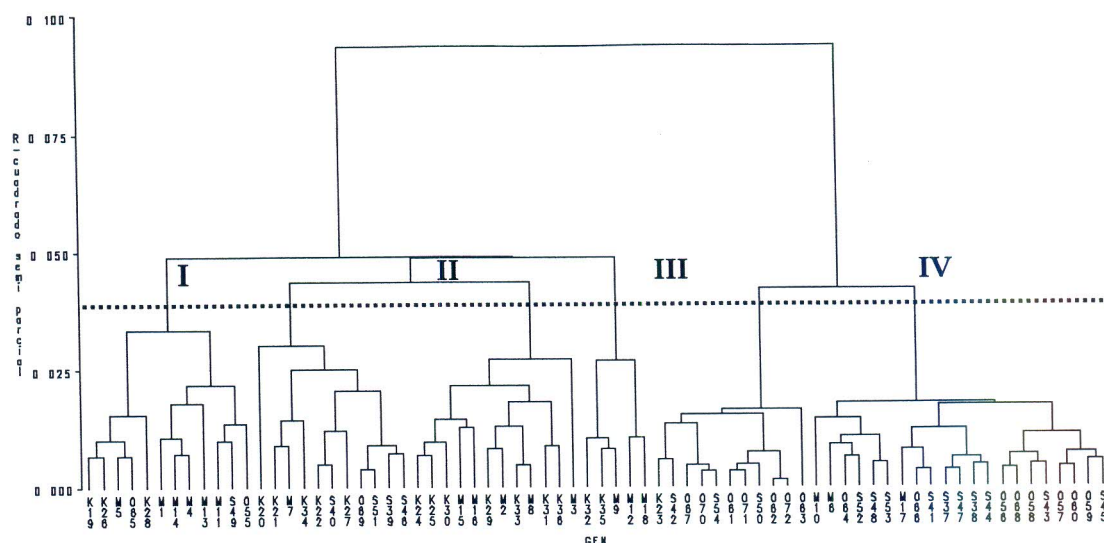


Figura 2. Diagrama de agrupamiento jerárquico de las 72 plantas por su morfología. M= Media China; K= Sassaoka; O = Oaxaca; S = San Cristóbal.

Cuadro 9. Características cualitativas evaluadas en tallo, rama, brote y hoja.

CAR	Grupo I	%	Grupo II	%	Grupo III	%	Grupo IV	%
CT	Verde	58.3	Verde	47.8	Verde	40.0	Verde	71.9
PR	Inclinada	66.7	Inclinada	47.8	Erecta	60.0	Inclinada	71.9
CB	Verde	50.0	Verde	73.9	Verde	100.0	Rojizo	65.6
CA	Presente	91.7	Ausente	65.2	Ausente	100.0	Presente	87.5
ICA	Débil	66.7	Ausente	65.2	Ausente	100.0	Media	50.0
							Fuerte	28.0
PSC	Ausente o muy escasa	83.3	Ausente o muy escasa	65.2	Media	60.0	Ausente o muy escasa	81.3
GB	Delgado	66.7	Medio	60.9	Delgado	80.0	Delgado	75.0
FH	Trulada	75.0	Oblonga	52.2	Oblonga	60.0	Trulada	59.4
CSC	Fuerte	41.7	Media	60.9	Débil	80.0	Débil	68.8
TOR	Ausente	58.3	Ausente	82.6	Ausente	80.0	Ausente	100.0
CNC	Presente	91.7	Presente	100.0	Ausente	80.0	Presente	100.0
GC	Medio	58.3	Débil	56.5	Ausente	80.0	Débil	50.0
							Medio	50.0
OM	Presente	58.3	Ausente	65.2	Presente	60.0	Ausente	90.6
GO	Débil	58.3	Ausente	65.2	Débil	60.0	Ausente	90.6
FBH	Redondeada	58.3	Redondeada	52.2	Redondeada	60.0	Obtusa	96.9
FPH	Atenuada	91.7	Apiculada	52.2	Atenuada	100.0	Apiculada	53.1

CAR= Característica; CT= Color del tallo; PR= Posición de las ramas; CB= Color del brote; CA= Coloración por antocianinas; ICA= Intensidad; PSC= Pubescencia; GB= Grosor del brote; FH= Forma de la hoja; CSC= Curvatura en la sección de la cruz; TOR= Torcimiento; CNC= Curvatura del nervio central; GC= Grado de curvatura; OM= Ondulación del margen; GO= Grado de ondulación; FBH= Forma de la base de la hoja; FPH= Forma de la punta de la hoja.

crecieron más, presentan los mayores índices de biomasa fresca y seca, tienen las hojas pequeñas y muchos ápices radicales (Cuadros 10 y 11).

Cuadro 11. Valores de las características cuantitativas de la planta por grupo.

VAR	Grupo I			Grupo II			Grupo III			Grupo IV		
	MEDIA	DE	CV	MEDIA	DE	CV	MEDIA	DE	CV	MEDIA	DE	CV
LHUE	87.4	12.2	7.2	106.2	17.0	6.2	88.8	7.5	11.8	99.8	15.0	6.6
DR3ph	2.4	0.4	6.2	3.0	0.6	5.1	2.7	0.2	11.1	2.7	0.4	6.2
AP	131.6	21.8	6.0	123.7	20.6	6.0	142.4	24.5	5.8	110.5	21.6	5.1
IA	24.7	11.6	2.1	28.7	15.3	1.9	29.6	16.3	1.8	24.5	11.9	2.1
IAPR	29.2	14.1	2.1	31.3	15.5	2.0	30.0	16.5	1.8	25.8	11.7	2.2
IDT	4.2	2.2	1.9	3.6	1.4	2.5	2.2	0.9	2.5	2.9	1.4	2.0
IDPR	1.7	1.2	1.5	1.3	1.1	1.3	1.5	0.7	2.0	1.7	1.1	1.6
AF	10701.5	2742.2	3.9	10125.3	2552.5	4.0	9829.6	910.4	10.8	8557.8	3728.2	2.3
PSH	97.5	17.9	5.4	88.4	20.9	4.2	83.3	10.2	8.2	66.3	26.8	2.5
PFH	273.8	60.0	4.6	257.5	58.0	4.4	248.4	26.5	9.4	194.5	82.7	2.4
PFT	312.8	62.6	5.0	284.9	81.0	3.5	291.1	58.1	5.0	196.8	82.9	2.4
PST	144.0	26.1	5.5	134.2	39.6	3.4	144.8	37.2	3.9	89.9	36.6	2.5
NAR	33.3	24.5	1.4	31.5	19.6	1.6	35.8	23.2	1.5	26.8	27.6	1.0
PSAR	0.1	0.1	1.2	0.1	0.1	0.8	0.1	0.1	1.1	0.0	0.1	0.6
PFR	369.1	146.1	2.5	273.8	80.9	3.4	215.7	61.2	3.5	313.3	115.0	2.7
PSR	142.9	53.1	2.7	104.3	27.8	3.8	95.1	17.0	5.6	110.3	44.5	2.5
AAR	44.1	13.8	3.2	38.4	9.9	3.9	41.2	13.6	3.0	27.1	5.7	4.8
DAR	2.4	0.8	2.9	2.0	0.8	2.5	2.3	0.8	2.8	1.5	0.7	2.2
IBF	1.8	0.8	2.3	2.1	0.7	3.0	2.6	0.4	6.7	1.3	0.5	2.7
IBS	1.8	0.7	2.7	2.2	0.5	4.5	2.4	0.5	4.9	1.5	0.4	3.3

VAR= Variable; DE= Desviación estándar; CV= Coeficiente de variación; LHUE= Longitud de hojas del último entrenudo; DR3ph= Diámetro de rama al tercer par de hojas; AP= Altura de la planta; IA= Incremento en altura; IAPR= Incremento en altura a la primera rama; IDT= Incremento en diámetro del tallo; IDPR= Incremento en diámetro de la primera rama; AF= Área foliar; PSH= Peso seco de hojas; PFH= Peso fresco de hojas; PFT= Peso fresco de tallo; PST= Peso seco de tallo; NAR= Número de ápices radicales; PSAR= Peso seco de ápices radicales; PFR= Peso fresco de raíz; PSR= Peso seco de raíz; AAR= Ángulo del extremo terminal del ápice radical; DAR= Diámetro del ápice radical; IBF= Índice de biomasa fresca; IBS= Índice de biomasa seca.

El grupo IV está integrado por 32 genotipos principalmente de Oaxaca y San Cristóbal, K23, S42, O67, O70, S54, O61, O71, S50, O62, O72, O63, M10, M6, O64, S52, S48, S53, M17, O66, S41, S37, S47, S38, S44, O56, O68, O58, S43, O57, O60, O59, S45 (Figura 2). Se distingue cualitativamente por brote rojizo y delgado, de media a fuerte coloración por antocianinas, hoja trulada con la base obtusa y la

punta apiculada, curvatura en la sección de la cruz débil y en la nervadura central de débil a media (Cuadro 9). Cuantitativamente se distinguen ser las plantas de menor tamaño, con el menor ángulo de inserción de las hojas y los valores menores de la mayoría de las características evaluadas (Cuadros 10 y 11).

De lo anterior se puede inferir que en el grupo I se concentraron los individuos de tamaño mayor, que los del grupo II y III son de tamaño intermedio y los del IV son los más pequeños.

Con los resultados del análisis discriminante canónico se encontró que la proporción explicada por la primera función fue 63 % de la variabilidad de los datos, en tanto que la contribución de la segunda correspondió a 23 %; los valores propios fueron 10.16 y 3.78 respectivamente y los valores absolutos de la estructura canónica total oscilaron entre 0.60 y 0.45. En la representación gráfica de los individuos con base en las dos funciones discriminantes, es posible observar la separación entre los grupos encontrados con el análisis de conglomerados (Figura 3). Esta tendencia se respalda con los valores de la distancia de Mahalanobis que fueron altamente significativos ($P \leq 0.01$) entre todos los grupos, 31.17 entre I y II, 40.14 entre I y III, 125.13 entre I y IV, 27.12 entre II y III, 80.58 entre II y IV y 64.48 entre III y IV.

Las variables con mayor aportación a la Función discriminante 1 con signo positivo son forma de la base de la hoja, peso seco de tallo, índice de biomasa seca y ángulo de ápices radicales y con signo negativo curvatura de la nervadura central y coloración por antocianinas. Para la Función discriminante 2 con signo positivo curvatura de la nervadura central, longitud de la hoja del último entrenudo, ángulo de inserción, diámetro de rama del tercer par de hojas y área de la hoja (Figura 3, Anexo 5).

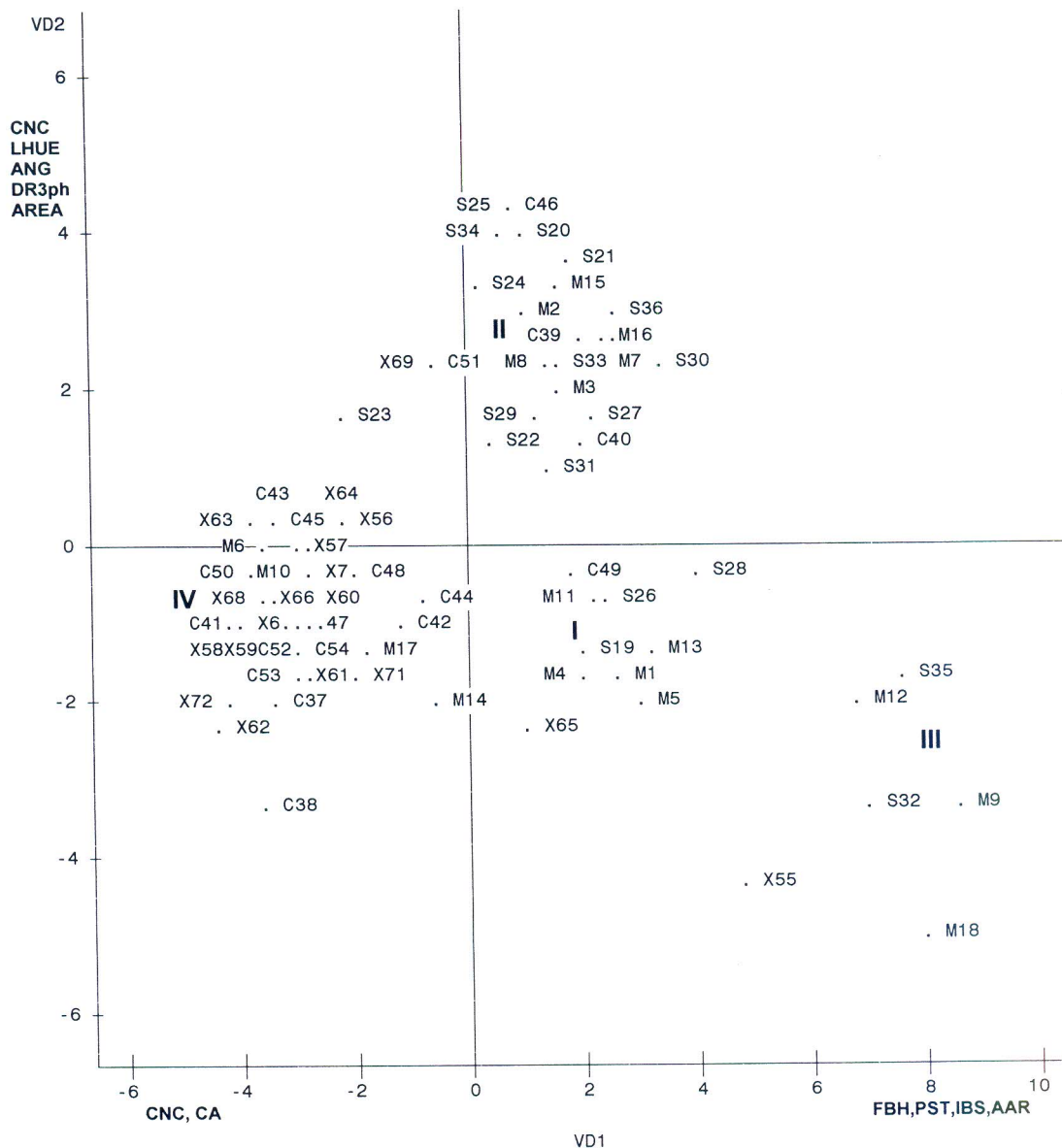


Figura 3. Representación gráfica de las dos primeras Funciones Discriminantes Canónicas. M= Media China; S= Sassaoka; X = Oaxaca; C = San Cristóbal. FBH= Forma de la base de la hoja; PST= Peso seco de tallo; IBS= Índice de biomasa seca; AAR= Ángulo del extremo terminal del ápice radical; CNC= Curvatura del nervio central; CA= Coloración por antocianinas; LHUE= Longitud de hojas del último entrenudo; ANG= Ángulo de inserción del tercer par de hojas; DR3ph= Diámetro de rama al tercer par de hojas; AREA= Área.

6.4.2 Variabilidad genética encontrada en las plantas de guayabo en estudio, con marcadores moleculares RAPD

De los productos amplificados con los 20 iniciadores RAPD, se obtuvieron un total de 255 bandas para los 71 genotipos de guayabo en estudio y la mayoría mostraron polimorfismos (89 %) (Cuadro 12, figura 4). La variación genética detectada en general fue importante, así lo indica el valor del coeficiente de similitud 0.45 al que se formaron los grupos (Figura 18). Los alelos que se manifiestan más tienen valores de probabilidad superiores al 40 % y corresponden a bandas encontradas con los iniciadores B1 (1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 11, 14, 16, 17, 18, 19), B14 (3) y B17 (2,13,14).

Cuadro 12. Características de los oligonucleótidos utilizados para la obtención de los patrones de bandeo y polimorfismo encontrado por genotipo.

Oligo-nucleótido	Secuencia	Productos amplificados	Tamaño pb	Polimorfismo por genotipo (%)			
				MC	SS	SC	OX
OPB01	5'-GTT TCG CTC C-3'	21	300-10000	90	95	95	86
OPB02	5'-TGA TCC CTG G-3'	5	350-875	40	0	20	0
OPB03	5'-CAT CCC CCT G-3'	4	220-1400	100	50	75	25
OPB04	5'-GGA CTG GAG T-3'	16	100-2500	94	56	88	6
OPB05	5'-TGC GCC CTT C-3'	9	375-2000	100	11	89	100
OPB06	5'-TGC TCT GCC C-3'	16	100-2900	31	0	94	38
OPB07	5'-GGT GAC GCA G-3'	11	250-1400	55	45	73	82
OPB08	5'-GTC CAC ACG G-3'	14	260-3700	57	0	71	36
OPB09	5'-TGG GGG ACT C-3'	5	100-400	40	0	60	0
OPB10	5'-CTG CTG GGA C-3'	15	200-1600	40	33	73	73
OPB11	5'-GTA GAC CCG T-3'	13	200-2000	62	31	77	38
OPB12	5'-CCT TGA CGC A-3'	11	250-1250	82	82	73	55
OPB13	5'-TTC CCC CGC T-3'	16	200-2000	56	19	19	0
OPB14	5'-TCC GCT CGT G-3'	13	250-2000	77	62	77	62
OPB15	5'-GGA GGG TGT T-3'	16	250-2900	94	81	69	44
OPB16	5'-TTT GCC CGG A-3'	9	300-2000	44	33	100	0
OPB17	5'-AGG GAA CGA G-3'	16	100-2000	100	75	81	75
OPB18	5'-CCA CAG CAG T-3'	17	250-2500	65	71	71	24
OPB19	5'-ACC CCC GAA G-3'	16	200-2500	38	25	6	0
OPB20	5'-GGA CCC TTA C-3'	12	100-1000	100	67	33	8
Total		255					
Número de loci polimórficos		226		176	118	174	103
% de polimorfismo		89		69	46	68	40

MC = Media China, SS = Sassaoka, SC = San Cristóbal, OX = Oaxaca.

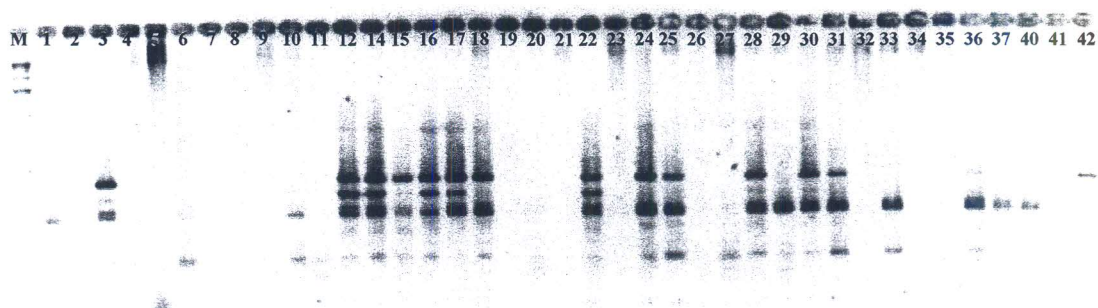


Figura 4. Patrones de bandeo de RAPD en plantas de guayabo Media China (1-18), Sassaoka (19-36) y San Cristóbal (37-42) con el iniciador OPB17.

Dentro de las poblaciones en estudio, el polimorfismo fue 20 a 49 % menos que el polimorfismo total, Media China y San Cristóbal presentaron los mayores valores y Sassaoka y Oaxaca los menores (Cuadro 12). El número de alelos observados es mayor para Media China y San Cristóbal y menor para Sassaoka y Oaxaca; el número de alelos efectivos conserva una tendencia similar con el mínimo para Oaxaca (Figura 5). Los coeficientes de similitud a los que se formaron grupos dentro de cada población fueron menores y con valores muy parecidos en Media china y San Cristóbal (0.37 y 0.38), en el caso de Sassaoka y Oaxaca fueron mayores (0.51 y 0.43) (Figuras 19, 20, 21 y 22). Lo anterior indica que las poblaciones de guayabo San Cristóbal y Media China son genéticamente más variables, es decir están compuestas por genotipos con mayores diferencias entre sí y por el contrario, Oaxaca y Sassaoka presentan mayor similitud entre sus genotipos.

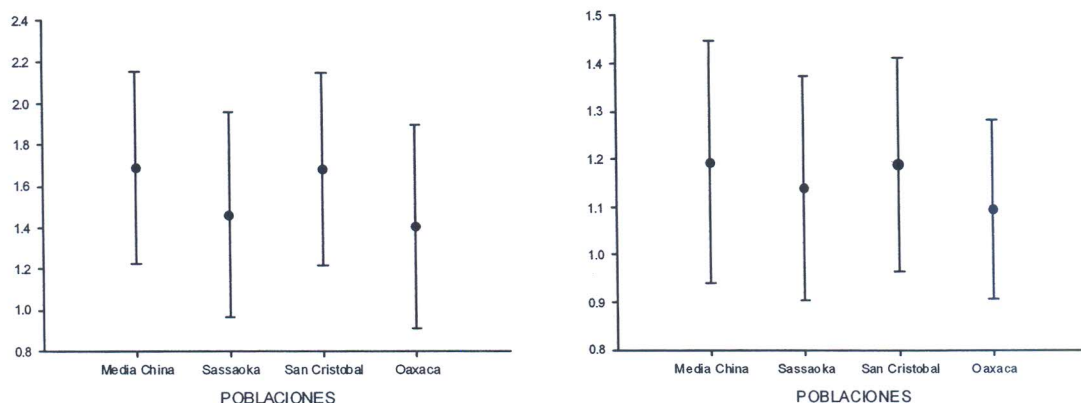


Figura 5. Valores medios y desviación estándar del número de alelos observados y efectivos por población.

Con el análisis de la estructura de las poblaciones por locus, se encontraron 24 alelos que no están en equilibrio, es decir no presentan un patrón de herencia neutro (3:1), lo que significa que la posibilidad de heredarse a las siguientes generaciones es reducida y corresponden a bandas generadas por los iniciadores B1, B7, B8, B13, B17, B18, B19 y B20 (Cuadro 13).

En la representación gráfica de las poblaciones en estudio se observa la formación de varios grupos; el primero formado por San Cristóbal y Oaxaca a una distancia genética de 0.227, el segundo lo integra este mismo grupo además de Media China a una distancia de 0.087 y fuera de ambos se observa a Sassaoka (Figura 6). Este agrupamiento puede estar relacionado con el origen de los genotipos ya que San Cristóbal y Oaxaca provienen del sur de México, Media China del centro y Sassaoka de Brasil.

Cuadro 13. Valores significativos ($P \leq 0.05$) del análisis de χ^2 de los loci encontrados en cuatro poblaciones de guayabo.

Locus	χ^2 Total	Media China		Sassaoka		San Cristóbal		Oaxaca	
		Alelo1	Alelo2	Alelo1	Alelo2	Alelo1	Alelo2	Alelo1	Alelo2
B1-2	18.5132	1.9166	3.1825	2.4388	4.0495	1.4693	2.4397	1.1340	1.8830
B1-7	14.1139	0.3397	0.5109	3.9911	6.0026	0.1307	0.1965	1.1751	1.7674
B1-9	8.9872	0.1407	0.1488	2.7117	2.8674	0.0060	0.0063	1.5098	1.5965
B1-11	9.4304	0.0481	0.0563	3.0777	3.6041	0.5406	0.6330	0.6774	0.7932
B1-14	12.2169	0.0199	0.0504	2.3958	6.0763	0.6808	1.7267	0.3583	0.9088
B1-15	7.9908	0.0621	0.2023	1.0052	3.2744	0.4711	1.5346	0.3385	1.1027
B1-18	13.4795	1.4861	7.8500	0.1111	0.5870	0.0362	0.1910	0.5123	2.7060
B1-19	9.5624	1.4218	3.0345	0.2837	0.6056	1.1607	2.4773	0.1847	0.3942
B7-2	8.1901	0.0124	0.2179	0.0548	0.9660	0.3207	5.6544	0.0517	0.9123
B8-2	13.3275	0.0594	1.0043	0.0594	1.0043	0.0594	1.0043	0.5656	9.5708
B13-5	12.2455	0.5058	8.6353	0.0583	0.9960	0.0583	0.9960	0.0551	0.9407
B13-6	10.2002	0.3542	7.2600	0.0409	0.8374	0.0409	0.8374	0.0386	0.7409
B17-12	10.1521	0.0226	0.3390	0.4660	6.9921	0.0749	1.1246	0.0708	1.0621
B17-16	10.7782	1.6531	4.4787	0.0134	0.0362	1.1119	3.0123	0.1274	0.3453
B18-1	8.2736	0.0271	0.6853	0.2351	5.9410	0.0271	0.6853	0.0256	0.6472
B18-8	8.1624	0.0772	0.5736	0.6198	4.6022	0.0000	0.0001	0.2717	2.0177
B18-11	7.6158	0.7561	4.5059	0.0672	0.4007	0.0138	0.0821	0.2572	1.5329
B18-15	9.7396	0.0000	0.0000	0.5562	5.8631	0.1480	1.5596	0.1397	1.4730
B19-3	10.2002	0.3542	7.2600	0.0409	0.8374	0.0409	0.8374	0.0386	0.7909
B20-3	8.2736	0.2351	5.9410	0.0271	0.6853	0.0271	0.6853	0.0256	0.6472
B20-5	10.9752	0.7155	6.1517	0.0039	0.0333	0.2181	1.8754	0.2060	1.7712
B20-9	8.7770	0.4263	5.6788	0.0031	0.0412	0.0944	1.2570	0.0891	1.1872
B20-10	7.8239	0.5153	4.9926	0.0263	0.2544	0.0263	0.2544	0.1642	1.5904
B20-12	8.9610	0.4635	4.0532	0.0453	0.3963	0.2113	1.8473	0.1995	1.7447

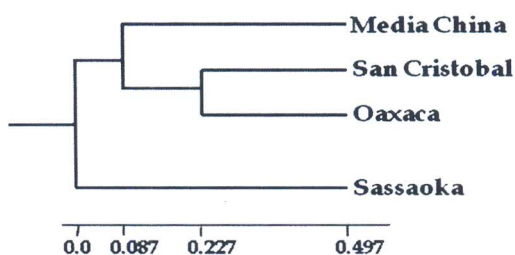


Figura 6. Dendrograma con base en la distancia genética de Nei y el método UPGMA, para cuatro tipos de guayabo.

6.4.3 Efectos de las deficiencias de B, Cu, Fe, Mn y Zn sobre el crecimiento de las plantas de guayabo en estudio

Los resultados del análisis de varianza del efecto de los tratamientos de deficiencias de micronutrientes sobre las plantas de guayabo, indican que no hay diferencias significativas por tratamiento, ni con la interacción tipo por tratamiento, pero si por tipo. En este caso, altura de la planta, incremento en altura a la primera rama y el ángulo de ápices radicales presentan diferencias altamente significativas; el peso fresco de hojas y tallo, peso seco de hojas, tallo, raíz y ápices radicales, diámetro de rama al tercer par de hojas, incremento en altura e índices de biomasa fresca y seca tuvieron diferencias significativas, mientras que el área foliar, peso fresco de raíz, número y ancho de ápices radicales, longitud de hojas del último entrenudo, diámetro de rama al tercer par de hojas, incremento en diámetro del tallo y diámetro a primera rama fueron estadísticamente similares (Cuadro 14, 15 y 16).

Cuadro 14. Cuadrados medios del análisis de varianza del efecto de los tratamientos sobre características físicas de hojas y tallos.

Fuente de variación	gl	AF	PFH	PSH	PFT	PST	LHUE	DR3ph
Tipo	3	18756861.6	24051.8*	3442.7*	100537.2*	22520.8*	105.242	0.8843*
Tra	5	9686923.1	4100.6	304.8	2495.3	554.3	126.037	0.0908
Tipo*Tra	15	5184374.3	5118.4	543.9	4409.7	1080.7	271.071	0.2409
Error	71	9818099.2	4190.9	474.4	4314.2	950.1	294.803	0.256
Media		9504.1	231.6	79.7	250.8	116.9	99.2	2.8
C. V.		0.34	0.33	0.33	0.37	0.37	0.17	0.19

TRA = Tratamiento; gl = grados de libertad; *= $P \leq 0.05$; **= $P \leq 0.01$; AF= Área foliar; PFH= Peso fresco de hojas; PSH= Peso seco de hojas; PFT= Peso fresco de tallo; PST= Peso seco de tallo; LHUE= Longitud de hojas del último entrenudo; DR3ph= Diámetro de rama al tercer par de hojas.

Cuadro 15. Cuadrados medios del análisis de varianza del efecto de los tratamientos sobre características físicas de raíz y ápices radicales.

Fuente de variación	gl	PFR	PSR	NAR	PSAR	AAR	DAR
Tipo	3	22371.7	7302.7*	942.6	0.037*	591.0**	1.12
Tra	5	16623.1	1489.1	364.3	0.007	88.0	0.69
Tipo*Tra	15	7412.8	560.7	789.8	0.006	136.8	0.55
Error	71	14139.1	1882.1	555.3	0.005	114.8	0.73
Media		303.2	112.8	30.7	0.06	34.5	1.9
C. V.		0.38	0.38	0.82	1.28	0.34	0.45

TRA = Tratamiento; gl = grados de libertad; *= $P \leq 0.05$; **= $P \leq 0.01$; PFR= Peso fresco de raíz; PSR= Peso seco de raíz; NAR= Número de ápices radicales; PSAR= Peso seco de ápices radicales; AAR= Ángulo del extremo terminal del ápice radical; DAR= Diámetro del ápice radical.

Cuadro 16. Cuadrados medios del análisis de varianza del efecto de los tratamientos sobre características físicas de la planta completa, tallo y rama.

Fuente de variación	gl	AP	IA	IAPR	IDT	IDPR	IBF	IBS
Tipo	3	3923.5**	569.1*	942.8**	3.9	0.90	4.525 *	3.9085 *
Tra	5	263.5	304.7	222.9	3.3	0.85	0.3173	0.1183
Tipo*Tra	15	559.5	92.3	91.3	2.5	1.17	0.1503	0.1720
Error	71	390.9	174.9	178.2	2.7	1.20	0.4450	0.2482
Media		120.4	26.2	28.4	3.3	1.6	1.72	1.81
C. V.		0.20	0.52	0.49	0.51	0.69	0.43	0.34

TIPO = Genotipo; TRA = Tratamiento; gl = grados de libertad; *= $P \leq 0.05$; **= $P \leq 0.01$; AP= Altura de la planta; IA= Incremento en altura; IAPR= Incremento en altura a la primera rama; IDT= Incremento en diámetro del tallo; IDPR= Incremento en diámetro de la primera rama; IBF= Índice de biomasa fresca; IBS= Índice de biomasa seca.

Al analizar los resultados de la comparación de medias por tipos para estas variables Sassaoka tuvo los mayores promedios de área foliar, peso fresco y seco de las hojas, pesos fresco y seco del tallo, longitud de hoja del último entrenudo y el diámetro de rama al tercer par de hojas, índices de biomasa, ancho de los ápices radicales y ángulo del extremo terminal, lo que indica que este tipo se caracteriza por tener plantas muy grandes. La altura de la planta fue similar con Media China y San Cristóbal y el incremento en altura sólo con San Cristóbal.

Respecto al peso fresco y seco de raíz tuvo los menores valores (Cuadro 17, 18 y 19).

San Cristóbal tuvo los promedios mayores de peso fresco y seco de las hojas y diámetro de rama al tercer par de hojas. Los promedios menores fueron para la longitud de hoja del último entrenudo, área foliar, pesos fresco y seco del tallo, índice de biomasa seca, ángulo del extremo terminal y ancho de los ápices radicales. Los promedios de altura total e incremento en altura fueron estadísticamente similares a Sassaoka (Cuadro 17, 18 y 19).

Media China tuvo los promedios mayores del peso fresco y seco de las hojas, pesos fresco y seco del tallo, altura de la planta e incremento en altura, incremento en altura a la primera rama, incremento en diámetro del tallo, número y peso seco de los ápices radicales y pesos fresco y seco de raíz lo que sugiere que fueron las plantas que crecieron más (Cuadro 17, 18 y 19).

Oaxaca en general tuvo los menores promedios de las características evaluadas, peso fresco y seco de las hojas, pesos fresco y seco del tallo, longitud de hoja del último entrenudo, diámetro de rama al tercer par de hojas, altura total, incremento en altura, incremento en altura a la primera rama, incremento en diámetro del tallo, índices de biomasa y número y peso seco de ápices radicales, lo que indica que las plantas de este tipo son de menor tamaño en comparación con los demás. En cuanto al peso fresco de raíz tuvo el mayor valor y fue igual que Media china (Cuadro 17, 18 y 19).

Respecto a los valores medios de los índices de biomasa, en general se observaron valores superiores a 1.0, lo que indica que la parte aérea se desarrolló más que la radicular (Cuadro 18).

Cuadro 17. Comparación de promedios de características físicas evaluadas en hojas, tallo y rama por tipo.

Tipo	AF	PSH	PFH	PFT	PST	LHUE	DR3ph
Sassaoka	10821a	95.14a	273.29a	293.45a	140.33a	101.15a	3.02a
Media china	9882a	89.25ab	255.93ab	335.91a	154.74a	97.27a	2.58a
Oaxaca	9384a	66.13c	194.27c	183.35b	85.04b	96.64a	2.61a
San Cristóbal	8372a	171.76bc	213.86bc	194.69b	89.36b	101.09a	2.94a
DMS	2779.7	19.32	57.43	58.27	27.35	15.23	0.45

DMS = Diferencia Mínima Significativa. Tukey $P \leq 0.05$; AF= Área foliar; PFH= Peso fresco de hojas; PSH= Peso seco de hojas; PFT= Peso fresco de tallo; PST= Peso seco de tallo; LHUE= Longitud de hojas del último entrenudo; DR3ph= Diámetro de rama al tercer par de hojas.

Cuadro 18. Comparación de promedios de los incrementos en altura, diámetro de tallo y rama e índices de biomasa evaluados por tipo.

Tipo	AP	IA	IAPR	IDT	IDPR	IBF	IBS
Media china	137.0a	31.83a	36.06a	3.65a	1.58a	2.05 ab	1.82 b
Sassaoka	127.9ab	28.26ab	30.89a	3.37a	1.49a	2.22 a	2.44 a
San Cristóbal	112.4 bc	26.32ab	27.87ab	3.51a	1.85a	1.49 bc	1.32 c
Oaxaca	104.4c	18.53b	18.81b	2.60a	1.31a	1.13 c	1.68 cb
DMS	17.54	11.73	11.84	1.46	0.97	0.59	0.44

DMS = Diferencia Mínima Significativa. Tukey $*P \leq 0.05$. AP= Altura de la planta; IA= Incremento en altura; IAPR= Incremento en altura a la primera rama; IDT= Incremento en diámetro del tallo; IDPR= Incremento en diámetro de la primera rama; IBF= Índice de biomasa fresca; IBS= Índice de biomasa seca.

Cuadro 19. Comparación de promedios de características físicas evaluadas en raíz por tipo.

Tipo	PFR	PSR	NAR	PSAR	AAR	DAR
Sassaoka	267.42a	97.88b	31.72a	0.057b	41.13a	2.05a
Media china	333.51a	140.76a	39.28a	0.130a	35.35ab	1.97a
Oaxaca	333.51a	114.15ab	22.56a	0.024b	34.42ab	1.89a
San Cristóbal	278.48a	98.28b	26.44a	0.048b	27.16b	1.49a
DMS	105.49	38.49	20.91	0.065	9.50	0.76

DMS = Diferencia Mínima Significativa. Tukey $P \leq 0.05$; PFR= Peso fresco de raíz; PSR= Peso seco de raíz; NAR= Número de ápices radicales; PSAR= Peso seco de ápices radicales; AAR= Ángulo del extremo terminal del ápice radical; DAR= Diámetro del ápice radical.

Las plantas con el tratamiento testigo, en general presentaron valores intermedios, respecto a los tratamientos deficientes, para el área foliar, peso fresco y seco de las hojas, pesos fresco y seco del tallo y longitud de hoja del

último entrenudo. Los promedios menores se observaron en la longitud de hojas del último entrenudo, diámetro de rama al tercer par de hojas, altura total las plantas y su incremento, incremento en altura a la primera rama, incremento en diámetro del tallo, ángulo de ápices radicales e índices de biomasa fresca y seca (Cuadro 20, 21, 22).

Las plantas con el tratamiento deficiente en hierro, tuvieron los promedios mayores de área foliar, incremento en altura y diámetro de la primera rama. La longitud de hoja del último entrenudo y el diámetro de rama al tercer par de hojas fueron similares con el tratamiento deficiente en boro (Cuadro 20, 21, 22).

Las plantas deficientes en boro, tuvieron valores intermedios de área foliar, mayores para el peso fresco y seco de las hojas, pesos fresco y seco del tallo, altura total, ancho de los ápices radicales y ángulo del extremo terminal, pesos fresco y seco de raíz. La longitud de hoja del último entrenudo fue similar a las plantas deficientes en hierro y el diámetro de rama al tercer par de hojas a las deficientes en cobre. Los promedios del número de ápices radicales y peso seco fueron menores (Cuadro 20, 21, 22).

Para las plantas con el tratamiento deficiente en cobre, el área foliar, pesos fresco y seco del tallo, tuvieron valores intermedios. Los promedios de la longitud de hoja del último entrenudo, diámetro de rama al tercer par de hojas, incremento en altura, incremento en diámetro del tallo e índices de biomasa fresca y seca fueron mayores. El incremento en altura a la primera rama fue mayor y similar con las plantas deficientes en hierro (Cuadro 20, 21, 22).

Las plantas deficientes en manganeso, tuvieron valores intermedios para el área foliar, peso fresco y seco de las hojas, tallo y raíz. Los promedios del número y peso seco de ápices radicales fueron mayores. El incremento en altura

de la planta fue mayor y similar al tratamiento deficiente en cobre. El diámetro de rama al tercer par de hojas fue mayor y similar a zinc. El incremento en diámetro del tallo fue similar a hierro. Los menores promedios corresponden a los índices de biomasa fresca y seca (Cuadro 20, 21, 22).

Las plantas con el tratamiento deficiente en zinc, tuvieron los menores promedios de área foliar, peso fresco y seco de las hojas, tallo y raíz y ancho de los ápices radicales. La longitud de hoja del último entrenudo y diámetro de rama al tercer par de hojas fue similar a manganeso (Cuadro 20, 21, 22).

Cuadro 20. Comparación de promedios de características físicas evaluadas en hojas, tallo y rama por tratamiento.

Tratamiento	AF	PSH	PFH	PFT	PST	LHUE	DR3ph
Hierro	10716a	79.2a	224.3a	252.0a	118.5a	100.46a	2.76a
Boro	10112a	88.2a	259.0a	264.8a	124.3a	100.43a	2.77a
Cobre	9930a	84.3a	250.1a	260.2a	117.5a	102.14a	2.77a
Testigo	9523a	79.1a	225.4a	253.2a	120.2a	92.81a	2.65a
Manganeso	9341a	79.0a	237.4a	256.9a	119.3a	99.40a	2.89a
Zinc	8068a	73.6a	209.0a	224.0a	104.3a	98.99a	2.87a
DMS	3796.5	26.4	78.4	79.6	37.3	20.80	0.61

DMS = Diferencia Mínima Significativa. Tukey $P \leq 0.05$; AF= Área foliar; PFH= Peso fresco de hojas; PSH= Peso seco de hojas; PFT= Peso fresco de tallo; PST= Peso seco de tallo; LHUE= Longitud de hojas del último entrenudo; DR3ph= Diámetro de rama al tercer par de hojas.

Cuadro 21. Comparación de promedios de los incrementos en altura, diámetro de tallo y rama e índices de biomasa evaluados por tratamiento.

Tratamiento	AP	IA	IAPR	IDT	IDPR	IBF	IBS
Testigo	112.83a	16.58a	20.92a	2.63a	1.29a	1.54a	1.64a
Hierro	121.71a	27.29a	31.75a	3.10a	1.89a	1.80a	1.89a
Cobre	119.87a	30.29a	31.71a	4.078a	1.22a	2.00a	1.91a
Boro	127.37a	26.12a	25.96a	3.74a	1.79a	1.70a	1.78a
Zinc	121.32a	26.91a	28.77a	3.04a	1.60a	1.68a	1.86a
Manganeso	119.37a	30.21a	31.33a	3.10a	1.57a	1.61a	1.79a
DMS	23.96	16.03	16.17	1.99	1.33	0.81	0.60

DMS = Diferencia Mínima Significativa. Tukey $*P \leq 0.05$. AP= Altura de la planta; IA= Incremento en altura; IAPR= Incremento en altura a la primera rama; IDT= Incremento en diámetro del tallo; IDPR= Incremento en diámetro de la primera rama; IBF= Índice de biomasa fresca; IBS= Índice de biomasa seca.

Cuadro 22. Comparación de promedios de características físicas evaluadas en raíz por tratamiento.

Tratamiento	PFR	PSR	NAR	PSAR	AAR	DAR
Hierro	267.0a	105.2a	29.5a	0.0706a	33.95a	1.95a
Boro	356.9a	127.7a	22.3a	0.0420a	38.66a	2.21a
Cobre	292.1a	110.2a	25.7a	0.0438a	36.71a	1.61a
Testigo	331.8a	122.4a	32.5a	0.0662a	31.54a	1.97a
Manganeso	310.2a	113.7a	37.8a	0.1078a	32.23a	1.78a
Zinc	261.4a	97.4a	32.3a	0.0597a	34.01a	1.59a
DMS	144.1	52.6	28.5	0.089	12.98	1.03

DMS = Diferencia Mínima Significativa. Tukey $P \leq 0.05$. PFR= Peso fresco de raíz; PSR= Peso seco de raíz; NAR= Número de ápices radicales; PSAR= Peso seco de ápices radicales; AAR= Ángulo del extremo terminal del ápice radical; DAR= Diámetro del ápice radical.

El análisis discriminante canónico realizado con las variables evaluadas para observar los efectos de los tratamientos deficientes sobre las plantas de guayabo en estudio, muestra que los valores propios de las dos y tres primeras funciones explican el 60 y 76 % de la variabilidad total presente y los valores de probabilidad no fueron significativos lo que indica que no hay grupos bien definidos (Cuadro 23). Este análisis también muestra que los valores absolutos de la estructura canónica total oscilan entre 0.0007 y 0.5. El incremento en altura y diámetro de tallo, peso seco y ángulo de ápices radicales fueron las características con mayor aportación a la variabilidad en la primera función discriminante. En la segunda fueron el incremento en altura de la planta y a la primera rama, peso fresco de raíz y ancho de ápices radicales. En la tercera, el incremento en altura a primera rama, área foliar y peso fresco de hojas (Anexo 6).

Cuadro 23. Valores propios de las Funciones Discriminantes Canónicas de los tratamientos evaluados.

Función discriminante	Valor propio	Proporción	Proporción acumulada	Probabilidad
1	0.6971	0.3957	0.3957	0.8725
2	0.4056	0.2302	0.6259	0.9745
3	0.2414	0.1370	0.7629	0.9832

En la representación gráfica de los individuos con base a las dos primeras funciones discriminantes no es posible observar grupos bien definidos (Figura 7), pero si tendencias. En el cuadrante I, predominan individuos sometidos a deficiencias de zinc (6), cobre (5) y manganeso (4). En el cuadrante II se observan en mayor cantidad individuos sometidos a deficiencias de boro (7) y cobre (6) y en menor frecuencia zinc. En el cuadrante III, predominan individuos inducidos a deficiencia de hierro (5) y el tratamiento testigo (5). En el cuadrante IV, se encuentran individuos inducidos a deficiencias de manganeso (5), hierro (4) y zinc (3). En los cuadrantes I, II y IV hay individuos con el tratamiento testigo en menor número (Figura 7).

En la representación gráfica de los individuos con base en las tres primeras funciones discriminantes se observa que los tratamientos se distribuyen aleatoriamente y no es posible ubicarlos en grupos definidos, sin embargo se puede observar la tendencia hacia el extremo positivo de la FC1 de los individuos inducidos a deficiencia de cobre, en el centro los de boro. En los extremos negativos de la FC1 y FC3 con el positivo de la FC2 es posible ubicar a los individuos inducidos a deficiencias de hierro y manganeso y por último los individuos deficientes en zinc así como los testigos son los más dispersos (Figura 8).

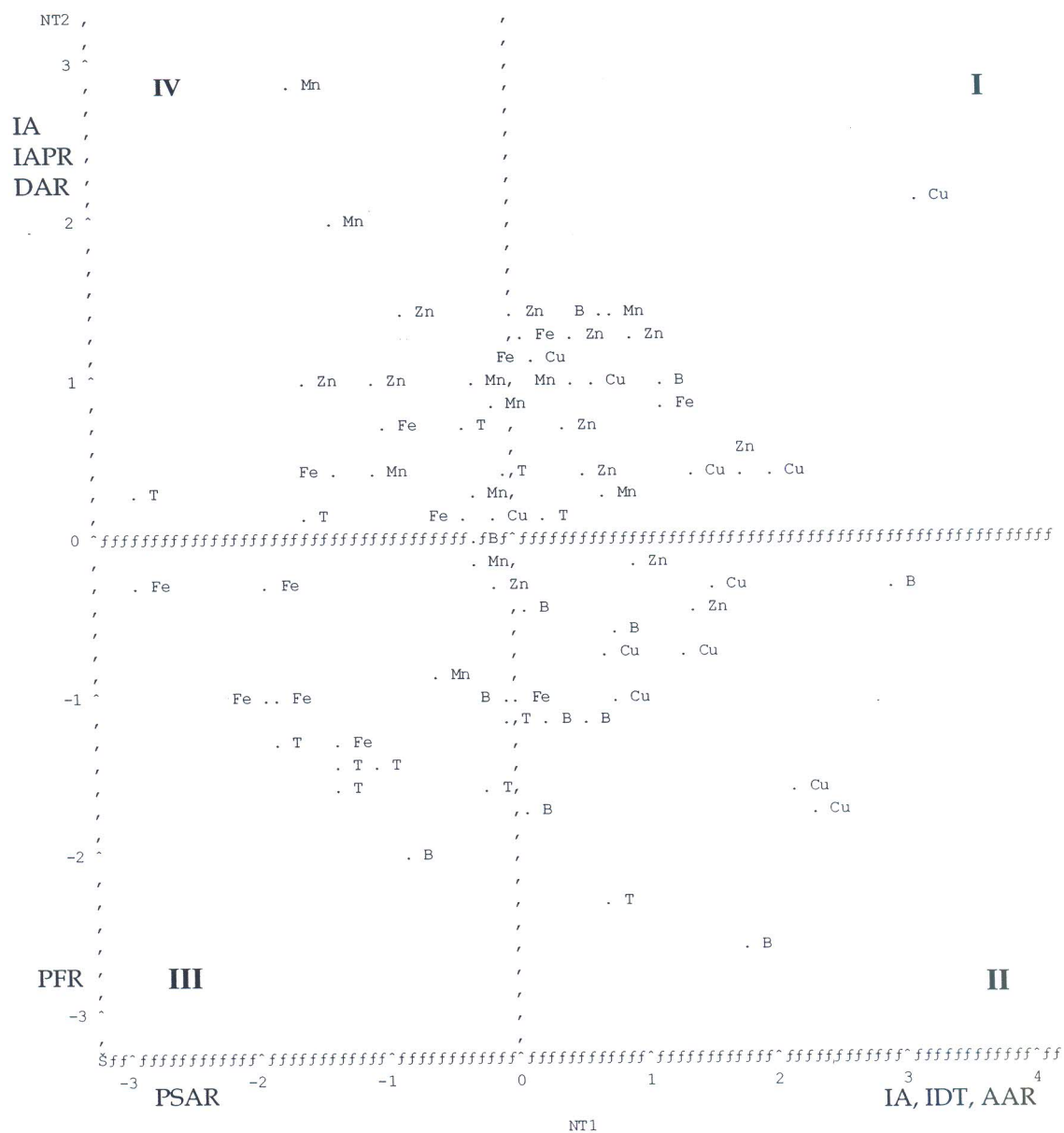


Figura 7. Representación gráfica de las dos primeras Funciones Discriminantes Canónicas de los tratamientos evaluados. IA= Incremento en altura; IDT= Incremento en diámetro del tallo; AAR= Ángulo del extremo terminal del ápice radical; PSAR= Peso seco de ápices radicales; PFR= Peso fresco de raíz; IAPR= Incremento en altura a la primera rama; DAR= Diámetro del ápice radical.

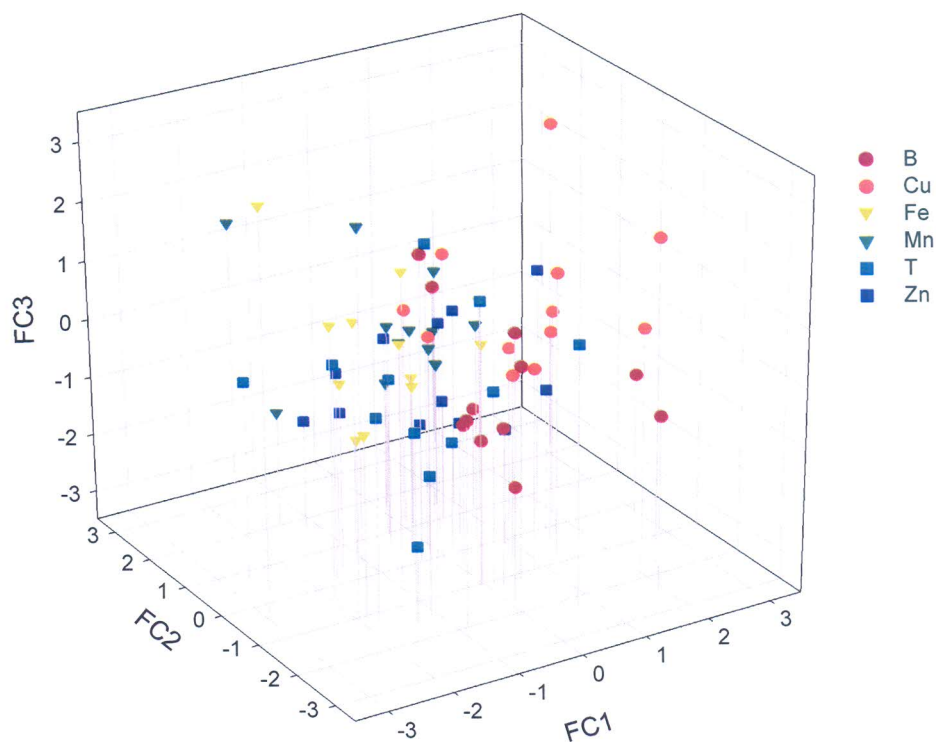


Figura 8. Representación gráfica de las tres primeras Funciones Discriminantes Canónicas de los tratamientos evaluados.

Los valores de probabilidad de la mayoría de los estadísticos obtenidos mediante al Análisis Discriminante Canónico no fueron significativos, lo que confirma la falta de agrupación entre los individuos sometidos a los mismos tratamientos (Cuadro 24).

Cuadro 24. Valores de probabilidad de los diferentes estadísticos obtenidos mediante al Análisis Discriminante Canónico de los tratamientos evaluados.

Estadístico	Valor	Pr > F
Wilks' Lambda	0.2311	0.8725
Pillai's Trace	1.2391	0.8423
Hotelling-Lawley Trace	1.7618	0.8839
Roy's Greatest Root	0.6971	0.0504

En general, los resultados del análisis discriminante indican que las deficiencias de zinc, cobre y manganeso afectaron los incrementos en altura de las plantas, diámetro de tallo y altura a la primera rama así como el diámetro y ángulo del extremo terminal de los ápices radicales (Cuadrante I, Figura 7). El Zn juega un papel fundamental en el metabolismo de las auxinas que son sintetizadas a partir del triptófano; en plantas deficientes se han observado bajos niveles tanto de triptófano como de esta hormona (Rahayu y Römheld, 2001). Las auxinas se sintetizan en los meristemos terminales del tallo y tejidos jóvenes y se trasladan formando un gradiente hacia la base del tallo. Estimulan el alargamiento celular o inhiben el crecimiento y sus efectos se observan en las yemas laterales, tallos secundarios, tallo principal o la raíz (Bidwell, 2002), lo que coincide con los efectos adversos observados en este trabajo.

Las deficiencias de boro y cobre afectaron negativamente al peso fresco de la raíz y de manera positiva a los incrementos en altura y diámetro de tallo, así como al ángulo del extremo terminal de los ápices radicales (Cuadrante II, Figura 7). Los resultados obtenidos en esta investigación, sobre los efectos de las deficiencias de boro y cobre en las plantas de guayabo, como son el desarrollo de la raíz limitado, tejidos atrofiados en tallos y hojas y crecimiento desproporcionado de la planta, coinciden con lo reportado por otros autores para estas deficiencias. En el caso del boro, forma complejos con manitol, ácido polimanurónico y otros componentes de las paredes celulares. Participa en el alargamiento celular y el metabolismo de los ácidos nucleicos y su deficiencia se relaciona con la muerte o ausencia de crecimiento de partes meristemáticas como consecuencia de la reducción en la actividad celular en relación a la división, diferenciación, maduración y respiración de la planta (De Oliveira, 1978; Taiz y Zeiger, 2002). El cobre, es componente de enzimas como la ácido ascórbico oxidasa, tirosina, monoamina oxidasa, uricasa, citocromo oxidasa, fenolasa, lacasa y plastocianina las cuales están involucradas en la transferencia

6.4.4 Síntomas de las deficiencias nutrimentales en las plantas

Aunque las deficiencias inducidas fueron de micronutrientes, se presentaron algunas de macronutrientes como N, P, K y Ca sin importar el tratamiento al que fueron sometidas, posiblemente por la interacción o sinergismo entre nutrientes.

6.4.4.1 Nitrógeno

En el caso del N se observó clorosis uniforme en gran parte de la lámina de las hojas (Figura 9). Singh y Singh (2007) reportan que el efecto de esta deficiencia sobre guayabo produce un limitado crecimiento de la planta, reducción del tamaño de hojas y brotes nuevos. Las hojas se tornan de un color pálido y se reduce la fructificación.

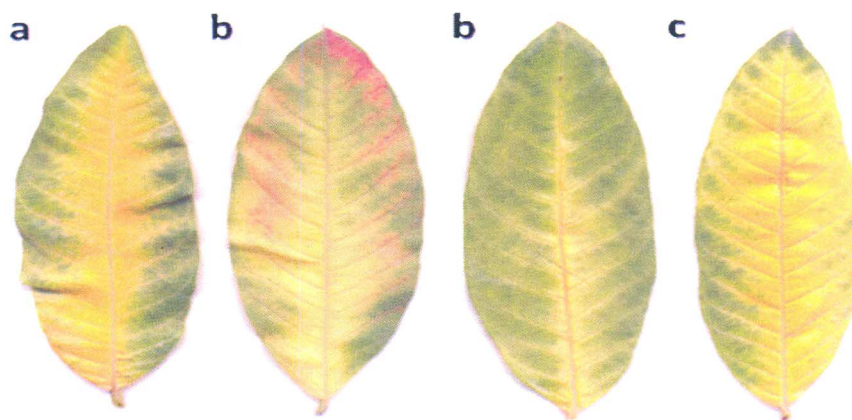


Figura 9. Deficiencia de nitrógeno en las plantas de guayabo a) inducidas a deficiencia de Cobre; b) Hierro y c) Manganeso.

El nitrato de amonio es una de las principales fuentes de nitrógeno inorgánico que se asimila por las raíces de las plantas superiores. En la reducción de este compuesto a amonio interviene el molibdeno como cofactor de la nitrato reductasa. El Nitrógeno juega un papel muy importante en la síntesis de proteínas que se lleva a cabo en los ribosomas. En este proceso participan otros elementos minerales como el Mg^{+2} para mantener el orden en la

de electrones durante la fotosíntesis. En casos de extrema deficiencia se observan deformaciones en las hojas y abscisión prematura (Taiz y Zeiger, 2002).

La deficiencia de hierro, afectó de manera negativa al peso fresco de raíz y peso seco de ápices radicales (Cuadrante III, Figura 7). Estos efectos coinciden con los observados por Shen *et al.* (2002), en genotipos de trigo sometidos a condiciones extremas de nutrición con Fe, donde encontraron diferencias notables en la producción de la materia seca de raíz y brotes. El hierro tiene un papel importante como componente de enzimas que intervienen en la transferencia de electrones (reacciones redox de Fe^{3+} a Fe^{2+}) en los citocromos. Los síntomas de deficiencia aparecen inicialmente en hojas jóvenes porque el hierro no puede ser movilizado de las hojas senescentes y se inhibe el desarrollo de membranas fotosintéticas en cloroplastos y tilacoides; bajo condiciones de extrema y prolongada deficiencia, las venas se tornan cloróticas y puede causar la defoliación completa de la planta (Taiz y Zeiger, 2002; Monge *et al.*, 1997).

Las deficiencias de manganeso, hierro y zinc afectaron los incrementos en altura de las plantas y altura a la primera rama así como el diámetro del ápice radical y de manera negativa el peso seco de los ápices radicales (Cuadrante IV, Figura 7). El manganeso es necesario para la activación catiónica de enzimas deshidrogenasas, descarboxilasas, kinasas, oxidasas, peroxidasas y destaca su participación en la reacción fotosintética a través de la cual el oxígeno se produce a partir de agua. Su deficiencia se relaciona con clorosis intervenal y el desarrollo de manchas necróticas en hojas jóvenes o senescentes dependiendo de la especie y etapa de crecimiento (Taiz y Zeiger, 2002).

involucrado en los procesos de elongación de la cadena polipeptídica; el Zn es un componente de la ARN polimerasa y el Fe participa en algunas rutas para integrar el ribosoma (Marschner, 2002).

Dentro de las interacciones del nitrógeno con otros elementos, la deficiencia de boro induce la acumulación de compuestos nitrogenados y carbohidratos simples en la planta lo que la inhabilita para completar la síntesis de proteínas, en consecuencia las plantas deficientes en boro tienen menor proporción de nitrógeno proteico. Se ha observado que las aplicaciones de fertilizantes nitrogenados tienen mayor efecto cuando se acompañan con boro (De Oliveira, 1978). Si se incrementan los niveles de N pueden aumentar los requerimientos del cobre dado que se incrementa el crecimiento. La fertilización nitrogenada aumenta de manera lineal los contenidos de cobre en las hojas y en presencia de altos niveles de N se puede inhibir la movilización de este (Kopsell y Kopsell, 2007).

6.4.4.2 Fósforo

La deficiencia de fósforo, indujo coloración rojiza en las hojas jóvenes y maduras en varias plantas sin importar el tratamiento deficiente. El síntoma se presentó, principalmente, en la época de invierno (Figura 10). Los efectos de esta deficiencia reportados para guayabo son crecimiento limitado del árbol, las hojas toman una coloración cobriza (bronceado) y en extrema deficiencia se caen de manera prematura (Singh y Singh, 2007).

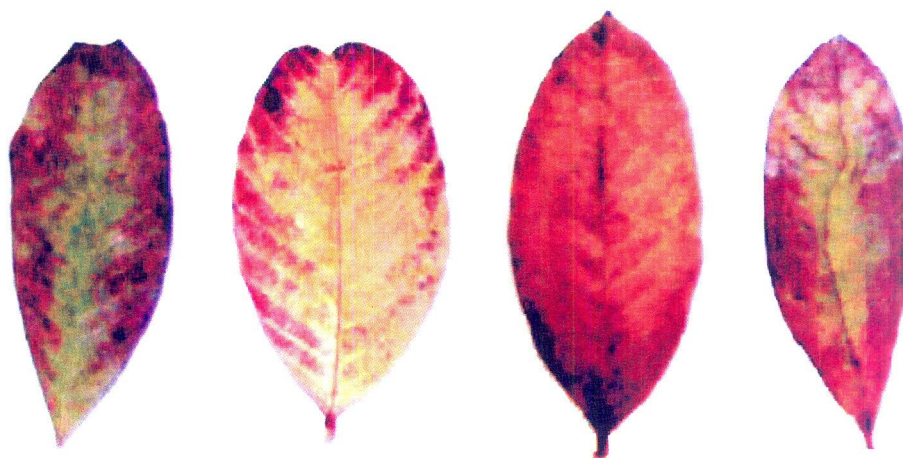


Figura 10. Deficiencia de fósforo en las plantas de guayabo en estudio.

Las deficiencias de hierro y fósforo en una solución nutritiva estimulan la absorción del cobre, pero el fósforo en abundancia disminuye la acumulación de este compuesto. En cítricos se ha observado que el uso intensivo de fertilizantes fosforados puede inducir deficiencias de cobre. En *Brassica* el exceso de fósforo en la solución nutritiva disminuyó la acumulación del cobre (Kopsell y Kopsell, 2007).

Bajo condiciones de deficiencia de zinc, se acumulan altos niveles de fósforo en los tejidos tanto de especies monocotiledóneas como dicotiledóneas. La principal razón de la elevada concentración en las hojas, es que la deficiencia de zinc aumenta la tasa de absorción de fósforo por las raíces y la movilización a los brotes, posiblemente por una mayor permeabilidad pasiva de las membranas plasmáticas de células de la raíz o por la pérdida de control de la carga del xilema regulada por la expresión de genes que codifican los transportadores de este elemento (Huang *et al.*, 2000; Storey, 2007).

6.4.4.3 Potasio

La deficiencia de potasio, al igual que las anteriores, se presentó en las plantas sometidas a deficiencias de Cu, B y Mn además de testigos (Figura 11).

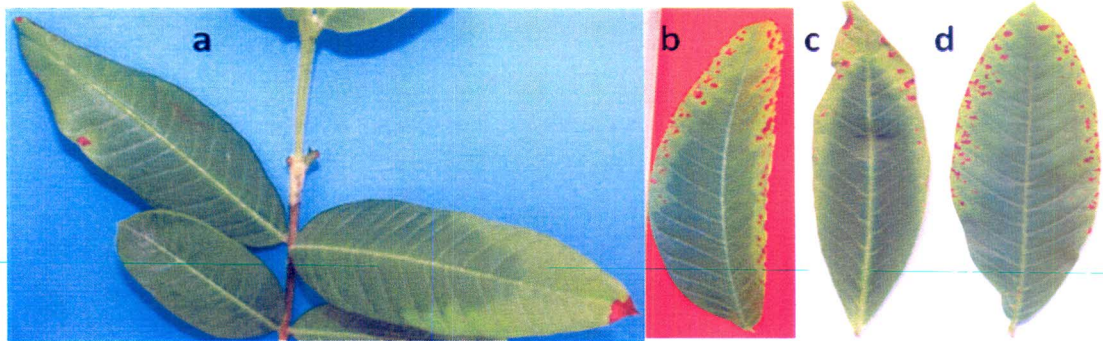


Figura 11. Deficiencia de potasio en plantas de guayabo inducidas a deficiencias de a) Cobre; b) Boro; c) Manganeso y d) Testigo.

El potasio es un activador de enzimas en la planta y participa en la síntesis de proteínas y procesos de la fotosíntesis y respiración. Los síntomas de deficiencia se observan en las hojas de mayor edad, aparecen clorosis y necrosis en forma de tiras a lo largo de las márgenes de la hoja que se amplifican en dirección basal (Mengel, 2007). Los síntomas observados en guayabo son que el árbol se torna enfermo y aparecen manchas cafés sobre las hojas que aumentan de tamaño y forman franjas (Singh y Singh, 2007).

Respecto a las interacciones con otros elementos se ha observado que las aspersiones foliares con potasio reducen el contenido de cobre en nogal (Kopsell y Kopsell, 2007) y que la deficiencia de este elemento puede afectar el contenido del boro de manera negativa (De Oliveira, 1978). En guayabo, se observó un efecto antagónico entre K, Ca y Mg, ya que al disminuir el potasio tiene a incrementar el calcio y el magnesio (Guerra y Bautista, 2002).

6.4.4.4 Calcio

La deficiencia de calcio también estuvo presente en varias de las plantas sometidas a deficiencias de micronutrientes y en algunos casos en plantas con el tratamiento testigo (Figura 12). Respecto a esta deficiencia se ha reportado la presencia de necrosis a lo largo del margen de las hojas y su caída en caso extremo (Singh y Singh, 2007).

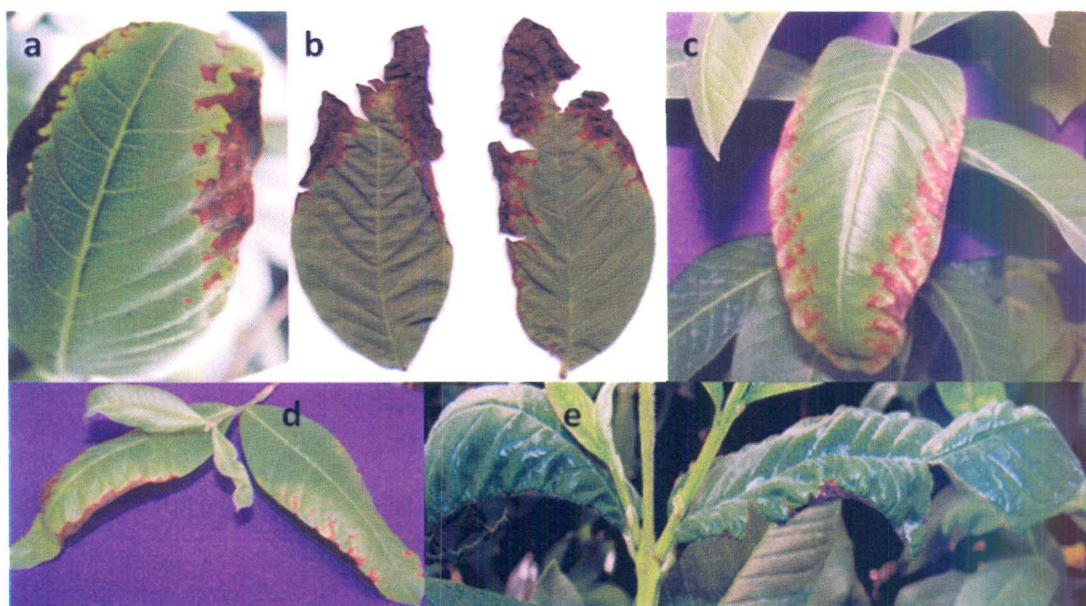


Figura 12. Deficiencia de calcio en plantas de guayabo inducidas a deficiencias de a) y b) Boro; c) y d) Manganeso; e) y el tratamiento testigo.

Desordenes fisiológicos asociados con la nutrición inadecuada de calcio se han observado en numerosas hortalizas y árboles frutales de gran importancia económica, por baja disponibilidad o asimilación de la planta y principalmente por su limitada capacidad para distribuirlo en el floema y tejidos no vasculares. El movimiento del calcio de las hojas viejas, que por lo general son ricas en este nutriente, a las partes jóvenes en crecimiento es extremadamente bajo y en ocasiones ausente, por ello los síntomas de deficiencia son comunes en órganos

y tejidos con bajas tasas de transpiración como frutos y hojas jóvenes con crecimiento rápido (Rahayu y Römheld, 2001).

Se han reportado interacciones del calcio con la presencia o ausencia de otros elementos, por ejemplo De Oliveira (1978), menciona que a medida que incrementa la relación $\text{Ca}:\text{B}^{-1}$ se observan síntomas de deficiencia de boro en las plantas. Rahayu y Römheld (2001), indican que con aplicaciones foliares de Zn se manifiesta un incremento en contenido de calcio en frutos de manzano por el aumento de la transpiración derivada de una mayor producción de auxinas que promovió el flujo de calcio hacia los frutos. Humphries *et al.* (2007), señalan que el calcio participa en la primera fase de la absorción del manganeso por las raíces la cual es rápida, reversible y no metabólica, con el libre intercambio entre el Mn^{+2} y el Ca^{+2} en la pared celular en el espacio apoplástico de las células de las raíces.

6.4.4.5 Boro

Los síntomas observados de la deficiencia de boro fueron la formación de estrías en el tallo y las nervaduras de las hojas por el envés (Figura 16a), acortamiento de entrenudos (Figura 16b), perforaciones y rasgaduras sobre la lámina foliar (Figura 16c). Los ápices radicales encontrados fueron cortos y gruesos y en algunos casos con el extremo terminal de color negro (Figura 16d).

En guayabo, para la deficiencia de Boro se ha reportado clorosis intervenal y endurecimiento de la parte afectada, los frutos son de tamaño reducido y en casos extremos se agrietan. Las hojas comienzan a caer (Singh y Singh, 2007).

En relación con otros elementos, en condiciones de alta acumulación de boro, la aplicación de nitrógeno o zinc reducen su nivel en las plantas y disminuye los síntomas de toxicidad por este elemento. La deficiencia de boro

acentúa los síntomas de toxicidad por potasio, debido a que el boro deja de regular la permeabilidad celular y por el contrario la disminución de los niveles de potasio estimula la acumulación de boro. La concentración de boro en las hojas incrementa con la fertilización con fósforo y por otro parte, la presencia de fósforo puede afectar a la toxicidad de boro en suelos calcáreos. El boro reduce los efectos de toxicidad por manganeso (De Oliveira, 1978; Gupta, 2007).



Figura 13. Deficiencia de boro en las plantas de guayabo en estudio: a) nervaduras y tallos y b) entrenudos en tratamiento Testigo c) hojas y d) ápices radicales.

6.4.4.6 Cobre

La deficiencia de cobre provocó la deformación de las hojas en el ápice en forma de hendiduras y bordes acerrados (Figura 15, a, b y c). En la parte superior del dosel de la planta se observó un alargamiento de los entrenudos y hojas (Figura 15d) así como la aparición de numerosos brotes laterales (Figura 15e). La mayoría de los ápices radicales fueron largos pero más gruesos que en las plantas deficientes en zinc, con el extremo terminal o en su totalidad necrosado (Figura 15f).



Figura 14. Deficiencia de cobre en las plantas de guayabo en estudio: a) inducidas a deficiencia de Manganeso y b) Hierro; c) hojas, d) entrenudos, e) brotes y f) ápices radicales.

Se ha reportado para guayabo como síntomas asociados a la deficiencia de cobre una coloración amarillo intensa en la punta de la hoja, en caso extremo la planta se defolia de la parte superior a la base del tallo (Singh y Singh, 2007). El alargamiento observado en las hojas y tallos jóvenes de las plantas sometidas a deficiencia de cobre en este trabajo, se relaciona con la pérdida de lignificación en los tallos documentada por Marschner (2002) para esta deficiencia.

En la interacción del cobre con otros elementos se ha encontrado que al aumentar la fertilización nitrogenada incrementa linealmente el contenido de este en los brotes y altos niveles de nitrógeno inhiben su movilización. El uso excesivo de fertilizantes fosforados induce deficiencias de cobre en cítricos y *Brassica*. Aspersiones foliares de potasio reducen el contenido en cobre en nogal. El calcio reduce la absorción de cobre en lechuga cultivada en hidroponía. La deficiencia de Fe ha estimulado la absorción de cobre en *Brassica* y maíz en solución hidropónica. El exceso de Fe en solución nutritiva disminuye los efectos de la toxicidad por Cu en espinacas. El cobre inhibe significativamente la absorción de zinc y viceversa. El cobre estimula la absorción de manganeso en varias especies de plantas (Kopsell y Kopsell, 2007).

6.4.4.7 Hierro

La deficiencia de hierro, se observó sobre las hojas con la característica coloración verde oscuro de las nervaduras que contrasta sobre el resto de la lámina foliar con clorosis (Figura 17a, b, c). Los ápices radicales fueron cortos, en algunos casos un poco gruesos y en otros presentaron algunas ramificaciones (Figura 17d). Los síntomas de deficiencia de hierro en guayabo se han documentado por otros autores como ausencia de clorofila en hojas jóvenes y amarillamiento intervenal (Singh y Singh, 2007).

En árboles de durazno la clorosis por deficiencia de hierro se manifiesta en hojas jóvenes y brotes nuevos, se incrementan los niveles de proteína y la cantidad de lípidos polares por unidad de clorofila y los compuestos fotosintéticos son los más afectados (Monge *et al.*, 1997).

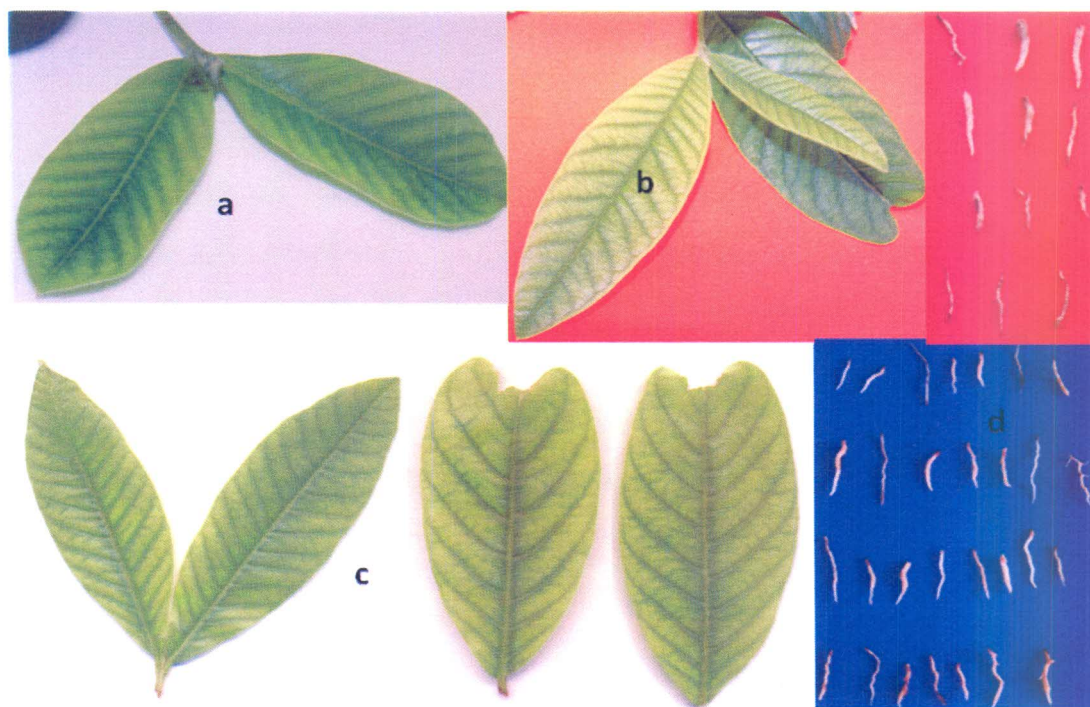


Figura 15. Deficiencia de hierro en las plantas de guayabo en estudio: a) deficientes en Cobre y b) deficientes en Boro c) hojas y d) ápices radicales.

Otros autores indican que la deficiencia de hierro es causada por la disminución de la actividad intrínseca de la enzima Fe(III)-quelato reductasa en los protoplastos del mesófilo, lo que puede inmovilizar o inactivar el transporte del hierro adquirido del sustrato hacia la hoja (Abadía *et al.*, 2002).

En la interacción del hierro con otros elementos se ha observado que altas concentraciones de Cu, Zn y Mn puede inducir clorosis férrica, por la sustitución de quelatos de hierro en el suelo y la inhibición de la respuesta a su

deficiencia (Römheld y Nikolic, 2007). Grasa *et al.* (2006), encontraron que la deficiencia de Fe afecta el movimiento de los macro y micro nutrimentos en plantas de *Prunus persica* L. ya que la remoción de nutrientes fue mucho mayor en plantas sanas que las deficientes. Para Mn y Fe el movimiento fue mayor al principio de la caída de las hojas y posteriormente en ramas se observó el movimiento de Cu y Zn.

6.4.4.8 Manganese

Los síntomas visibles por la deficiencia de manganeso fueron clorosis entre las nervaduras, deformación del ápice y nervaduras y la presencia de pequeñas manchas en el borde de la lámina foliar. En ápices radicales, en algunos casos, se observaron ramificaciones, mayor grosor y extremo terminal necrosado (Figura 13, a y b). La clorosis intervenal difusa (moteado) sobre las hojas en crecimiento observados en este trabajo, coincide con los síntomas documentados por Humphries *et al.* (2007) para esta deficiencia nutrimental en *Phaseolus vulgaris* L. y *Cucumis sativus* L.

Se ha observado en soya que existe un efecto antagónico entre el Fe y Mn, ya que al incrementarse la concentración de hierro disminuye la de manganeso por un incremento en la materia seca de plantas con la aplicación de hierro o por la acumulación de este en las raíces a niveles tóxicos, lo que limita la capacidad de asimilación del manganeso del suelo o la movilización a los brotes (Ghasemi-Fasaei *et al.*, 2003). El boro también contribuye a reducir los efectos de la toxicidad por manganeso (De Oliveira, 1978). Por otro lado, se ha demostrado que el cobre puede estimular la absorción de Mn en varias especies de plantas (Kopsell y Kopsell, 2007).

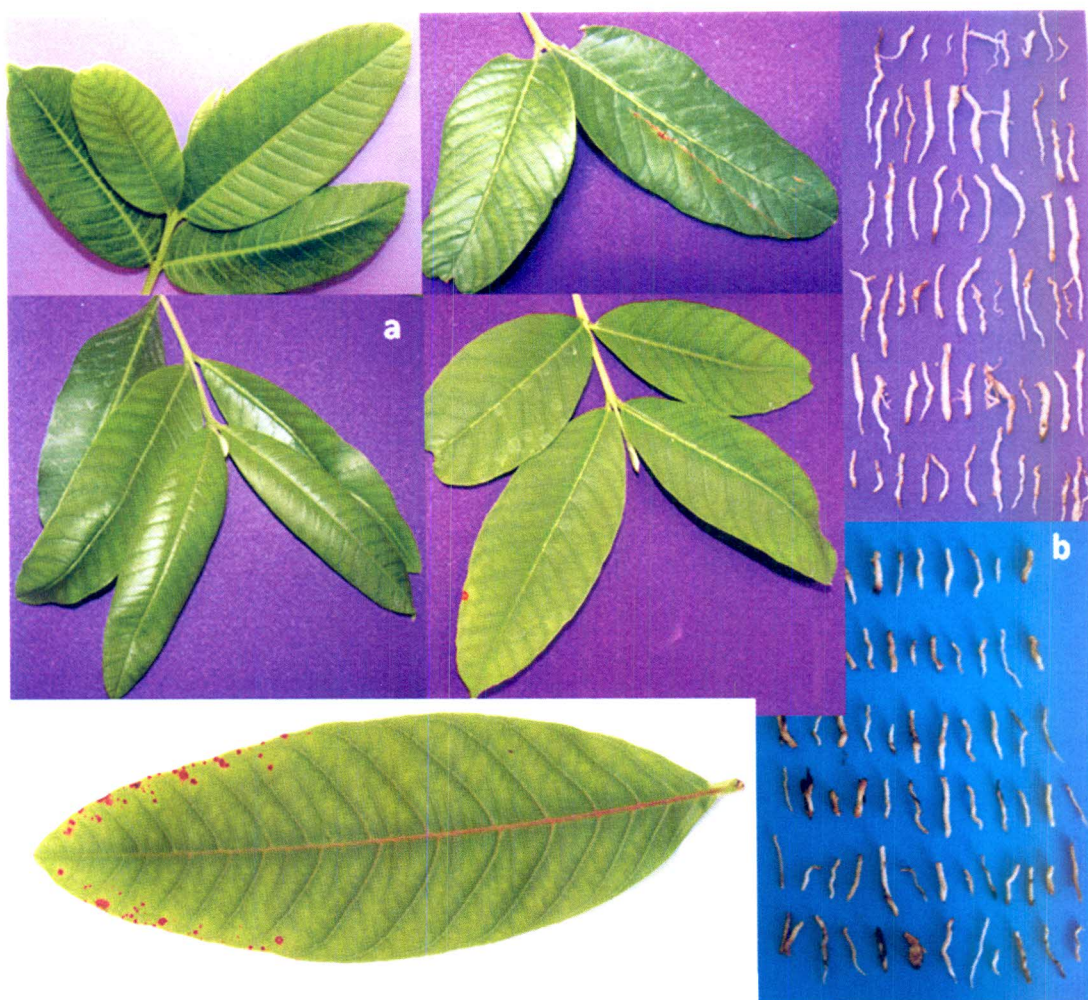


Figura 16. Deficiencia de manganeso en las plantas de guayabo en estudio:
a) hojas y b) ápices radicales.

6.4.4.9 Zinc

Los síntomas observados respecto a la deficiencia de zinc, fueron acortamiento de entrenudos (Figura 14a); clorosis a partir de la base de la hoja y sobre las nervaduras central y laterales (Figura 14b); clorosis en forma de bandas entre las nervaduras laterales (Figura 14c), adelgazamiento de los tallos y muerte de algunas ramas (Figura 14d), defoliación y retraso del crecimiento en la planta. El caso extremo se presentó en una de las repeticiones, con la muerte de la planta posterior a clorosis sobre las hojas, defoliación total y ausencia de ápices radicales. En general los ápices radicales de las plantas sometidas a este tratamiento fueron delgados y en algunos casos largos (Figura 14e).

Para esta deficiencia en guayabo se ha reportado que las hojas detienen su crecimiento y forman rosetas, se observa clorosis intervenal sobre el follaje, la planta reduce su crecimiento, las ramas se mueren, se reduce el número de flores y los frutos se anillan y agrietan (Singh y Singh, 2007).

Respecto a las interacciones con otros elementos, altos niveles de fertilización con fósforo disminuyen la concentración de zinc en los brotes y la deficiencia de zinc promueve la toxicidad por fósforo (Knight *et al.*, 2004). El cobre, inhibe significativamente la absorción de zinc y a la vez, se cree que este interfiere en el proceso de absorción del cobre (Kopsell y Kopsell, 2007).

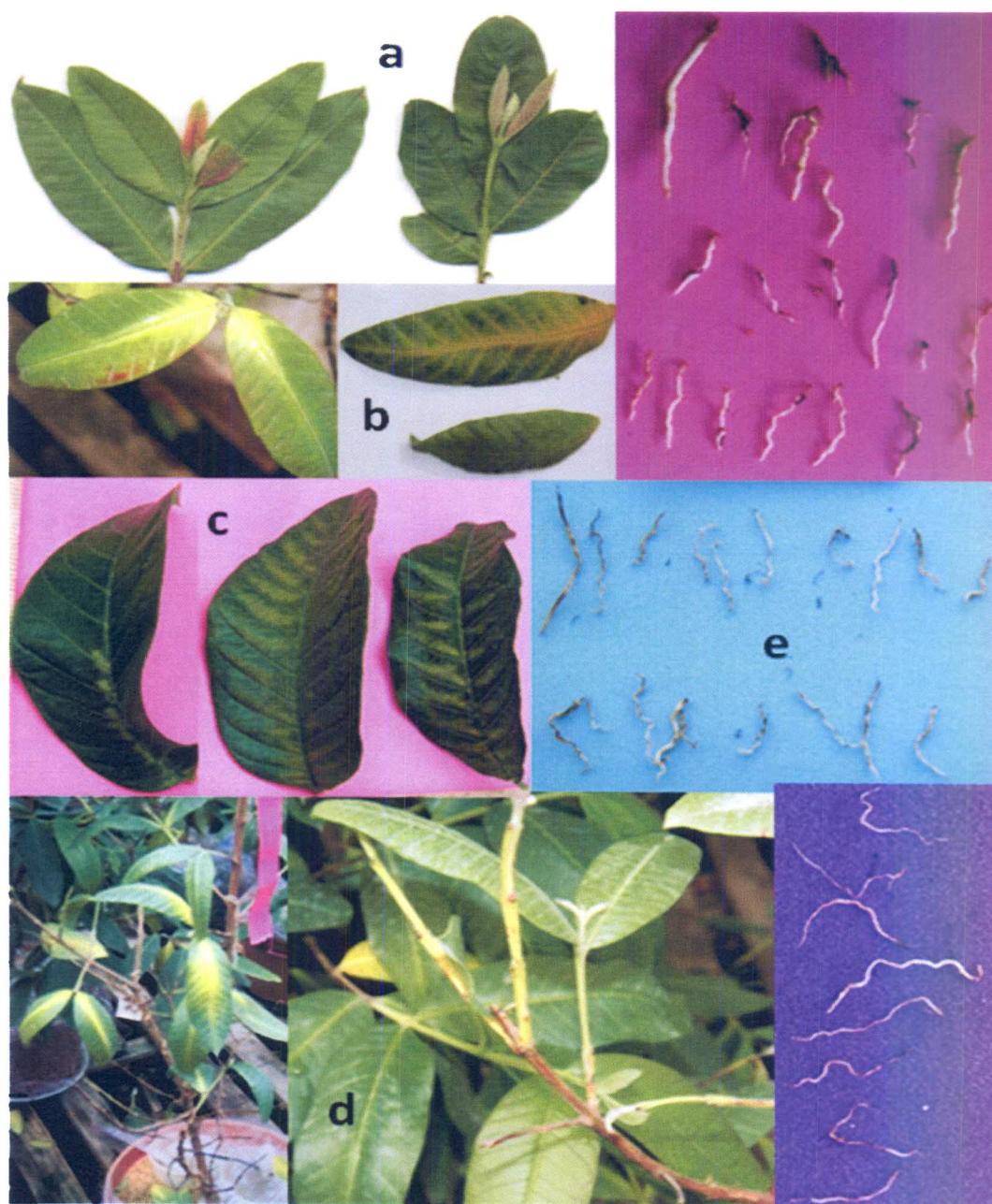


Figura 17. Deficiencia de zinc en las plantas de guayabo en estudio: a) entrenudos, b) y c) hojas, d) tallos y e) ápices radicales.

6.4.5 Contenidos de nutrimentos en muestras de tejido vegetal

En los resultados del análisis de tejido vegetal, el mayor de los contenidos promedio de los micronutrimentos en estudio corresponde a las plantas inducidas a deficiencia de hierro, le sigue el tratamiento deficiente en manganeso y los contenidos menores se presentaron en las plantas deficientes en zinc, boro y cobre. Los contenidos promedio de Cu, Mn y B en las plantas inducidas a estas deficiencias fueron superiores a los observados en el testigo y por el contrario, los de Fe y Zn fueron inferiores a este (Cuadro 25). Cabe señalar que a pesar de que las soluciones nutritivas se prepararon con agua destilada, reactivos con grado analítico y la superficie expuesta del sustrato en las macetas se cubrió con plástico, es posible que haya existido contaminación por partículas de polvo o por trazas en los reactivos.

Cuadro 25. Contenido promedio de los elementos analizados en las plantas por tratamiento.

Tratamiento		MO %	C %	N %	P %	K %	Fe mg.Kg ⁻¹	Cu mg.Kg ⁻¹	Zn mg.Kg ⁻¹	Mn mg.Kg ⁻¹	B mg.Kg ⁻¹
T	M	91.94	53.33	5.05	0.19	2.83	144.70	7.28	9.63	102.80	4.16
	S	0.99	0.58	0.83	0.04	0.19	28.11	4.22	2.17	29.15	0.89
	CV	0.01	0.01	0.16	0.23	0.07	0.19	0.58	0.23	0.28	0.21
Fe	M	93.04	53.97	5.00	0.21	2.82	136.58	6.57	9.83	101.66	6.73
	S	1.53	0.88	0.72	0.04	0.32	18.42	2.94	2.99	28.05	1.63
	CV	0.02	0.02	0.14	0.20	0.11	0.13	0.45	0.30	0.28	0.24
Cu	M	92.51	53.66	4.61	0.21	2.82	126.89	9.84	8.46	99.67	4.87
	S	0.90	0.52	0.82	0.04	0.17	21.70	4.30	1.92	31.65	1.50
	CV	0.01	0.01	0.18	0.18	0.06	0.17	0.44	0.23	0.32	0.31
Zn	M	92.81	53.83	3.83	0.19	2.64	118.98	5.02	7.49	127.46	5.65
	S	1.26	0.73	0.95	0.05	0.33	18.76	1.89	2.71	66.48	2.42
	CV	0.01	0.01	0.25	0.24	0.13	0.16	0.38	0.36	0.52	0.43
Mn	M	92.55	53.68	4.51	0.21	2.77	128.37	5.87	11.27	110.65	5.92
	S	0.76	0.44	0.63	0.06	0.19	22.43	2.88	3.97	16.29	2.20
	CV	0.01	0.01	0.14	0.27	0.07	0.17	0.49	0.35	0.15	0.37
B	M	92.29	53.53	4.58	0.19	2.92	122.76	8.57	9.51	110.13	6.90
	S	0.87	0.50	1.35	0.04	0.30	21.58	6.65	3.09	28.88	1.65
	CV	0.01	0.01	0.30	0.20	0.10	0.18	0.78	0.32	0.26	0.24

M=Media; S=Desviación estándar; CV=Coeficiente de variación; T=Testigo.

Al comparar los contenidos de micronutrientes en los tratamientos deficientes con los reportados por algunos autores, sólo en el caso de Zn y B se ubican por debajo del rango de deficiencia, Fe y Cu se ubican en el de suficiencia y Mn en el de exceso (Cuadro 26).

Cuadro 26. Límites del contenido de nutrientes en las hojas de guayabo.

Elemento	N	P	K %	Ca	Mg	S	Fe	Mn	Zn Mg.Kg ⁻¹	Cu	B
Deficiente	2.10-2.59	0.11-0.15	1.20-1.59	1.00-1.49	0.20-0.29	<0.20-0.24	50-59	20-29	20-24	3.0-4.0	17-19
Suficiente	2.6-3.00	0.16-0.22	1.60-1.22	1.50-2.60	0.30-0.75	0.25-0.40	60-250	30-100	25-200	5.0-20.0	20-70
Exceso	>3.00	>0.23	>2.20	>2.60	>0.75	>0.40	>250	>100	>200	>20	>70

Fuente: Singh y Singh, 2007.

Es posible que este comportamiento, esté relacionado con el movimiento de los elementos nutritivos de las zonas fuente de la planta hacía las de demanda, ya que las hojas destinadas al análisis de tejido foliar, se tomaron del tercer par (contados del ápice hacía la base de la rama), sitio indicado por algunos autores como de mayor estabilidad de los nutrientes (Sydney, 1986), no obstante está muy cercano a las zonas de crecimiento por lo que probablemente, a pesar de que la planta presentó los síntomas de deficiencia del tratamiento correspondiente, el micronutriente en cuestión estaba presente en las hojas que se analizaron. En trabajos realizados en guayabo respecto a la posición de las hojas sobre la rama, se encontró que los contenidos de N, Ca, y Mg incrementan de la base a la punta y por el contrario, P, K, Na, Zn y Mn disminuyen. En el caso del Cu no se observó tendencia alguna (Mitra, 1988).

6.4.6 Relación de los síntomas de deficiencias de micronutrientos con marcadores moleculares

6.4.6.1 Con base en los grupos de los dendrogramas general y por tipo

Si se considera un corte en 0.45 de coeficiente de similitud en el dendrograma construido a partir de los patrones de bandeo de las 71 plantas de guayabo en estudio, es posible observar 6 grupos y 15 individuos fuera de estos (Figura 18).

El grupo I está integrado por 7 individuos, de los cuales 5 son del tipo Media China y 2 de Sassaoka. Respecto a los tratamientos, 3 de estos individuos fueron inducidos a deficiencia de cobre, 2 a zinc, 1 a boro y 1 a hierro. El grupo II se formó con 19 plantas, 1 de Media China, 4 de San Cristóbal, 6 de Oaxaca y 8 de Sassaoka; 5 de éstas fueron inducidas a deficiencia de hierro, 5 a zinc, 3 a boro, 2 a manganeso, 1 a cobre y 3 testigos dos de los cuales presentaron deficiencias de Hierro. El grupo III integrado por seis plantas principalmente del tipo Media China, que en común presentan la deficiencia de manganeso. El grupo IV lo forman 15 individuos, 2 de Media China, 3 de Oaxaca, 4 de San Cristóbal y 6 de Sassaoka en los que predominan las deficiencias de hierro y cobre (Figura 18).

El grupo V está integrado por 4 individuos del tipo Oaxaca, principalmente con deficiencias de cobre y boro. El grupo VI lo forman 4 individuos de San Cristóbal y 1 de Media china, con deficiencias de hierro y cobre. Con el resto de los individuos, a una distancia de 0.16, se forman los grupos VII con plantas de Media china con deficiencias de cobre, zinc y boro y el grupo VIII con plantas de Oaxaca y San Cristóbal principalmente donde predomina la deficiencia de manganeso. Cabe resaltar, que en las etiquetas del dendrograma además del tratamiento deficiente inducido en cada planta, también se indica la presencia de síntomas de otras deficiencias al momento de finalizar el experimento, tales como calcio, nitrógeno, potasio, fósforo y magnesio (Figura 18).

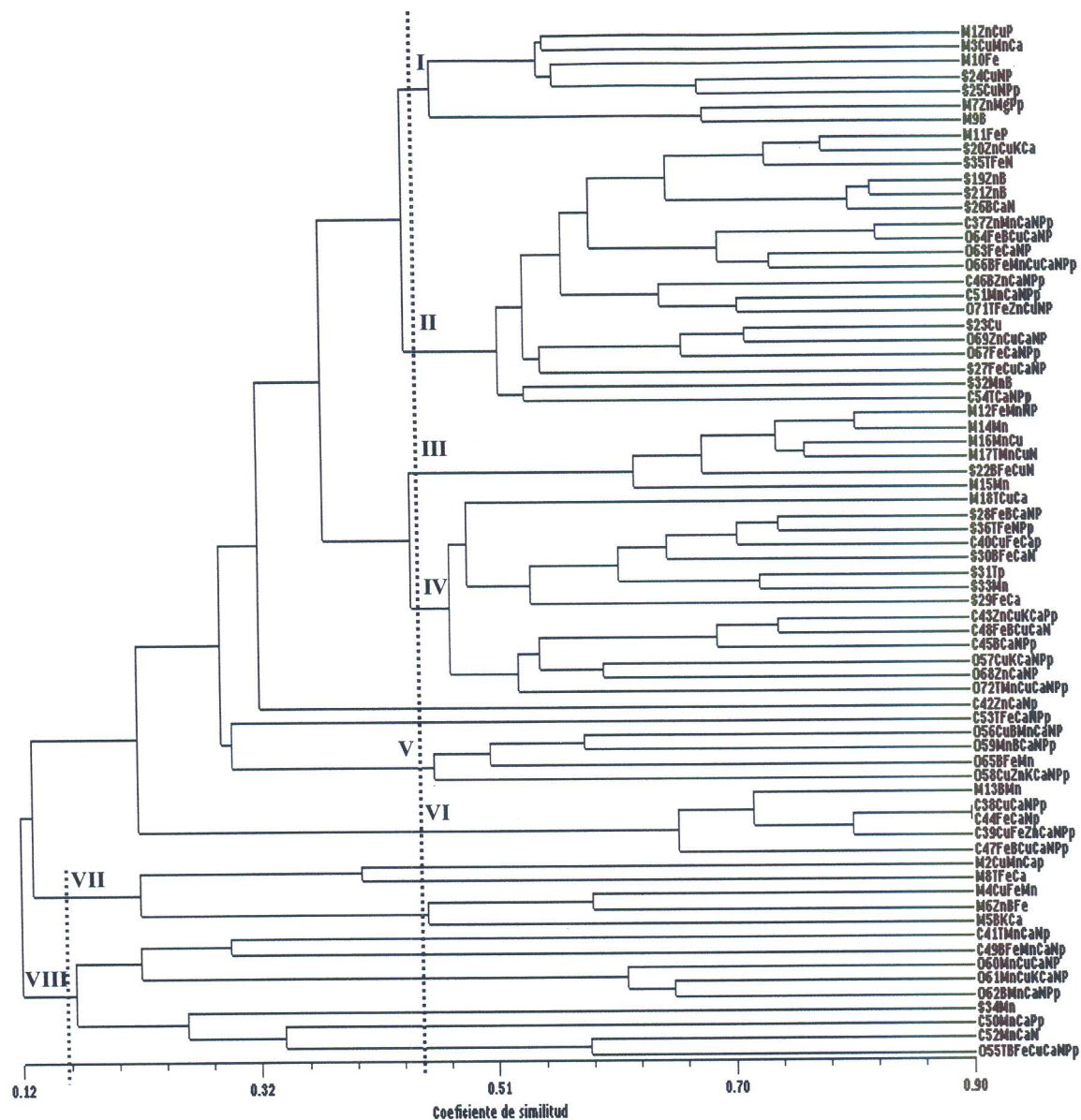


Figura 18. Agrupamiento de las 71 plantas de guayabo en función de los marcadores RAPD. M = Media China; S = Sassaoka; C = San Cristóbal; O = Oaxaca; T = Testigo; Zn = Zinc; Cu = Cobre; B = Boro; Fe = Hierro, Mn = Manganeso; Ca = Calcio; N = Nitrógeno, P = Fósforo en hojas senescentes; p = Fósforo en hojas jóvenes; K = Potasio.

En el dendrograma de las plantas del tipo Media China, al realizar un corte a una distancia de similitud aproximada de 0.37 se forman cuatro grupos. El I está integrado por 7 individuos inducidos a deficiencias de zinc, hierro, cobre, boro y testigo. El II por 5 plantas principalmente con deficiencia de manganeso. El III por 3 individuos con deficiencias de cobre, zinc y boro y el grupo IV por dos plantas, un testigo y una deficiente en hierro (Figura 19).

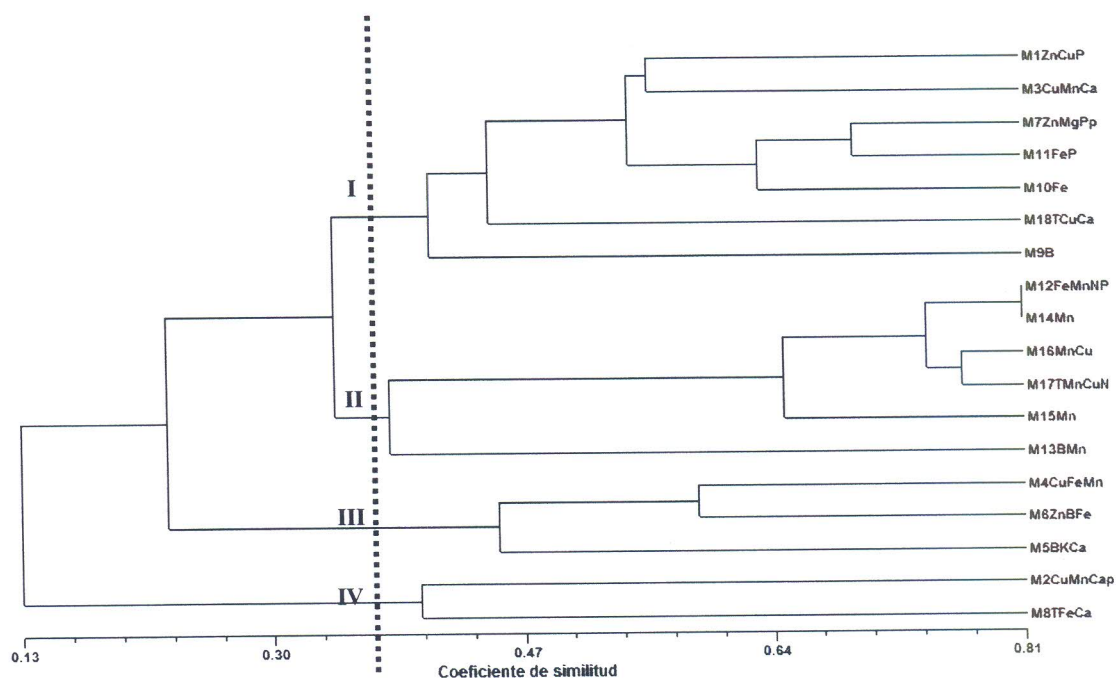


Figura 19. Agrupamiento jerárquico de las 18 plantas del tipo Media China.

En el dendrograma las plantas del tipo Sassaoka, al realizar un corte a una distancia de similitud aproximada de 0.51 es posible observar tres grupos. El I está formado por 7 individuos inducidos a deficiencias de zinc, boro, cobre, manganeso y testigo. El II por 4 plantas con deficiencias de cobre y hierro. El III con 5 individuos deficientes en hierro, boro, manganeso y testigo (Figura 20).

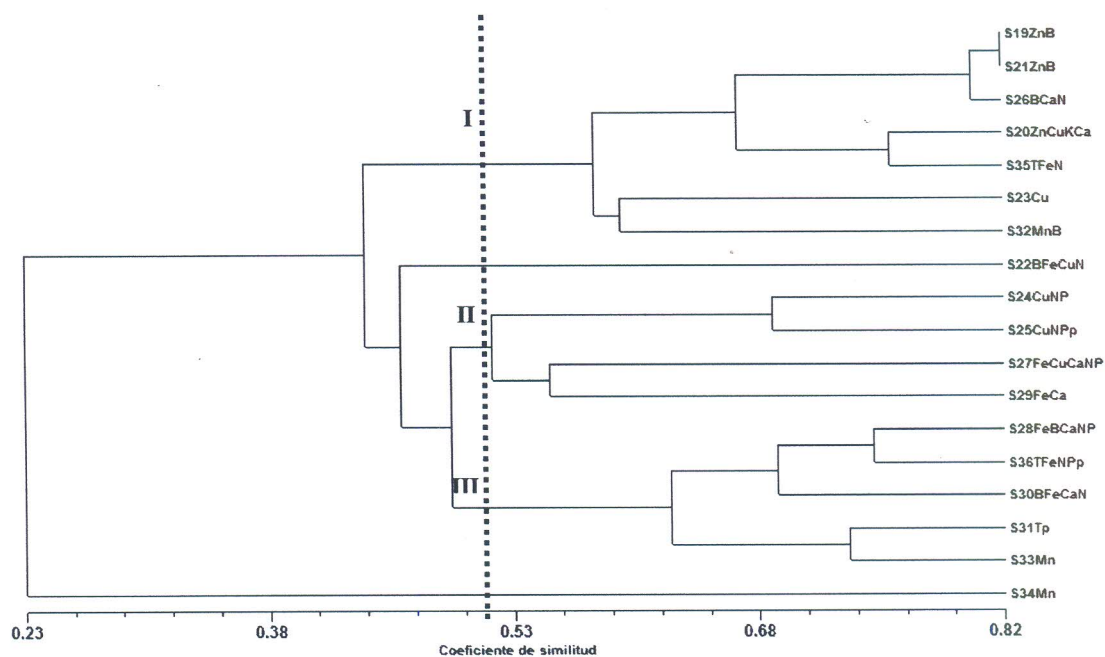


Figura 20. Agrupamiento jerárquico de las 18 plantas del tipo Sassaoka.

En el dendrograma las plantas del tipo San Cristóbal, al realizar un corte a una distancia de similitud aproximada de 0.38 se observan 4 grupos. El I está formado por 5 individuos inducidos a deficiencias de zinc, manganeso y testigo. El II por 5 plantas con deficiencias de zinc, cobre, hierro y boro. El III por 4 individuos deficientes en cobre y hierro y el grupo IV con individuos deficientes en manganeso (Figura 21).

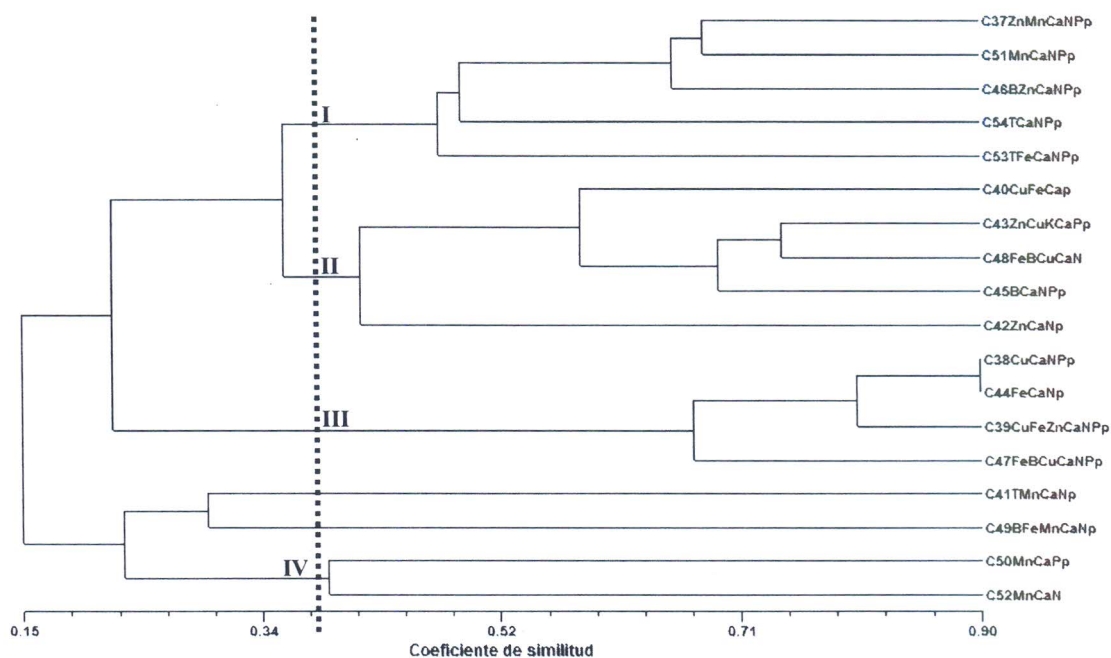


Figura 21. Agrupamiento jerárquico de las 18 plantas del tipo San Cristóbal.

En el dendrograma las plantas del tipo Oaxaca, al realizar un corte a una distancia de similitud aproximada de 0.43 es posible observar cuatro grupos. El I está formado por 3 plantas con deficiencias de manganeso y boro. El II por 7 plantas principalmente con deficiencias de hierro y cobre. El III por 3 plantas deficientes en boro, manganeso y cobre y el grupo IV con 3 plantas deficiente en cobre, zinc y testigo (Figura 22).

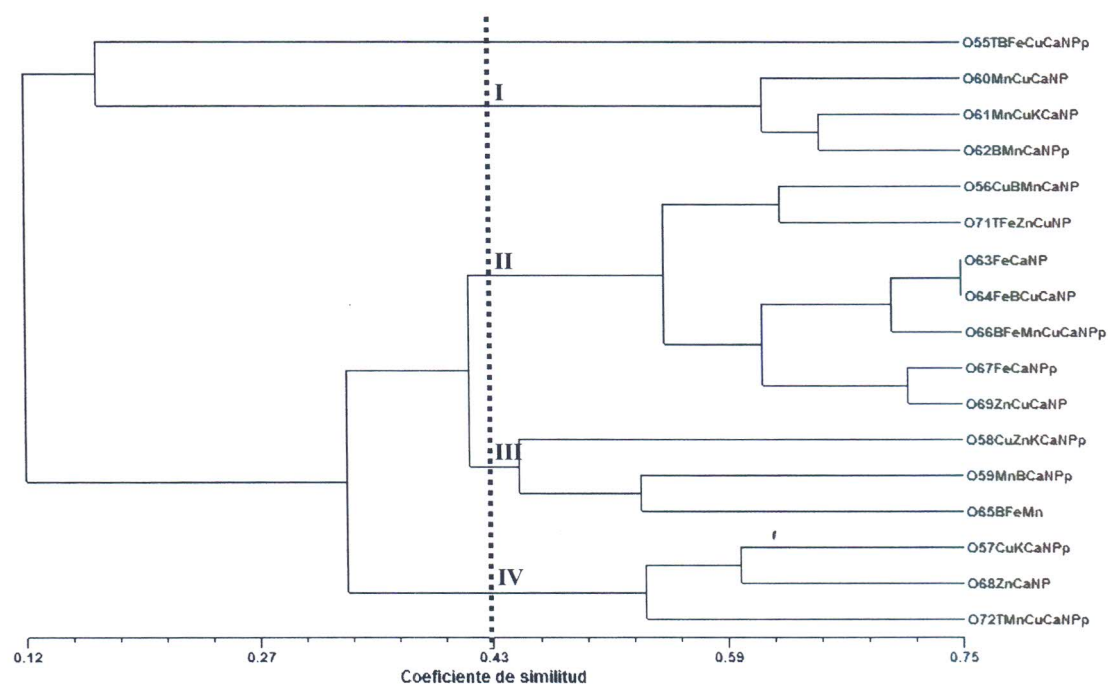


Figura 22. Agrupamiento jerárquico de las 18 plantas del tipo Oaxaca.

6.4.6.2 Mediante el análisis de correspondencia

La relación de bandas con las deficiencias de micronutrientes encontrada mediante el análisis de correspondencias no fue uniforme en todos los tipos, por ejemplo, la deficiencia de cobre en Media China presentó mayor asociación con las bandas 14 y 17 del iniciador B1, mientras que para Sassaoka fueron las bandas 19 y 17, para San Cristóbal la 12 y Oaxaca la 8 y 9. La mayoría de los iniciadores tales como el B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B13, B16, B19 y B20 no amplificaron, lo hicieron en pocos individuos o en determinados tipos (Anexo 7).

Los valores de la Inercia Principal por eje y el porcentaje de explicación acumulado al segundo eje por tipo muestran que para Media China los iniciadores B3, B4, B6, B10, B13, y B16 fueron los mejor representados con valores entre 85 y 100 %. El iniciador B3 presentó mayor asociación con plantas inducidas a deficiencia de Fe, B y Mn, el B4 con la deficiencia de Mn; el B6 con B y Cu; el B10 con Fe, Zn, Mn y B; el B13 con Cu, Fe, Mn y B y el B16 con Mn y B. Para Sassaoka, fueron los iniciadores B10, B11, B12, B19 y B20 con valores entre 81 y 100 % de representatividad, que se relacionaron principalmente con las deficiencias de B, Mn y Cu y en menor frecuencia con Fe y Zn. En San Cristóbal los mejores porcentajes de explicación fluctuaron entre 84 y 100 % con los iniciadores B3, B8, B9, B11, B12, B13 y B16 y en general se asociaron principalmente con las deficiencias de Cu y Fe además de Zn y B. En Oaxaca, los mayores valores de explicación fluctuaron entre 81 y 100 % con los iniciadores B6, B8, B11, B12 y B18 que se asociaron principalmente con las deficiencias de Mn, B y Cu.

Con este análisis, también se encontraron bandas de todos los iniciadores que se asocian con la deficiencia de diferentes elementos a la vez. Con poca frecuencia se asoció el B con Cu, Fe, Mn o Zn y por el contrario la más común es

la de Fe con Cu seguida de Mn y Zn, en los diferentes tipos de guayabo en estudio (Anexo 7).

6.4.6.3 Con los grupos formados por tratamiento

En la búsqueda de las bandas comunes entre los individuos agrupados por tratamiento sin importar el tipo, se encontró que la mayoría de las plantas inducidas a deficiencia de zinc comparten 5 bandas de un iniciador. Las inducidas a deficiencia de cobre tienen 8 bandas en común de 4 iniciadores. Las de hierro 11 bandas comunes de 3 iniciadores. Las de boro dos bandas comunes de dos iniciadores y las de manganeso 4 de dos iniciadores. Sólo en el caso de las plantas deficientes en hierro fue posible encontrar bandas comunes para todos los individuos (100 %) bajo este tratamiento, tales como la B1-5, B1-7 y la B1-13. Por el contrario, la menor frecuencia observada fue del 66 % para 3 bandas en plantas inducidas a deficiencia de manganeso (Cuadro 27).

En una investigación realizada en plantas de guayabo sometidas a baja disponibilidad de Fe y Zn y evaluadas mediante marcadores RAPD, se encontró asociación entre las plantas con síntomas y la presencia de la banda A03-3 con una frecuencia del 74 %. Las bandas A20-1,2 y 4 se relacionaron con la ausencia de los síntomas en una frecuencia de 86.5, 78 y 89 % y se consideró como una respuesta poligénica (Domínguez *et al.*, 2005).

Se tienen reportes sobre las interacciones entre algunos de los micronutrientes estudiados en este trabajo, por ejemplo, elevadas concentraciones de Cu, Zn y Mn pueden inhibir la clorosis férrica; la deficiencia de Fe estimula la asimilación del Cu; el exceso de Cu inhibe significativamente la disponibilidad del Zn y viceversa; altas concentraciones de Zn disminuyen la toxicidad por B; el Zn interviene en los procesos de absorción del Cu y este estimula la asimilación del manganeso (Barker y Pilbeam, 2007).

Cuadro 27. Bandas comunes entre las plantas en estudio por cada tratamiento.

Tratamiento	No. Total de individuos	Bandas comunes	No. de individuos con banda común	%
Zinc	11	B1-1	9	75.0
		B1-3	9	75.0
		B1-5	9	75.0
		B1-7	10	83.3
		B1-13	9	75.0
Cobre	12	B1-1	9	75.0
		B1-2	10	83.3
		B1-3	9	75.0
		B1-6	9	75.0
		B1-7	9	75.0
		B5-2	9	75.0
		B5-6	9	75.0
		B14-1	9	75.0
Hierro	12	B1-1	11	91.6
		B1-2	10	83.3
		B1-3	10	83.3
		B1-5	12	100.0
		B1-6	11	91.6
		B1-7	12	100.0
		B1-11	10	83.3
		B1-13	12	100.0
		B5-1	9	75.0
		B17-1	9	75.0
		B17-13	10	83.3
Boro	12	B1-7	9	75.0
		B5-2	9	75.0
Manganeso	12	B1-7	8	66.6
		B1-11	8	66.6
		B1-13	11	91.6
		B17-1	8	66.6

En trabajos realizados en soya en la búsqueda de genotipos resistentes a la clorosis por deficiencia de hierro, se identificó un patrón de herencia cuantitativo con varios genes y efectos aditivos. Posteriormente se estableció la relación mediante QTL entre alelos con múltiples loci y características cuantitativas (Fairbanks, 2000). En algas el gene *Crd1* activa el mecanismo para garantizar la función fotosintética bajo deficiencias de cobre u oxígeno ya que estas condiciones afectan la síntesis de la plastocianina (Moseley *et al.*, 2000). En

Arabidopsis thaliana se identificó un mutante sensible a la deficiencia de boro. La sección promotora se identificó como BOR1 y se relacionó con el transporte del boro por el xilema (Takano *et al.*, 2002). En las raíces de cebada, la deficiencia de Zn afecta los mecanismos de absorción y transporte del fósforo con la expresión de los genes HVPT1 y HVPT2 que codifican las proteínas de alta afinidad por este elemento. En este caso, el papel de Zn en la regulación de estos genes es específica ya que no puede ser sustituido por el manganeso u otro catión divalente similar (Huang *et al.*, 2000).

Estos comportamientos de los micronutrientes en las plantas, pueden ayudar a explicar el porqué los polimorfismos encontrados con los marcadores RAPD en este trabajo no se asocian de manera única con una deficiencia, ya que es posible que los procesos celulares implicados sean de mayor complejidad, de tal manera que se requieran técnicas moleculares más específicas para rastrear las regiones del ADN donde esté almacenada la información que los regula.

6.5 Conclusiones

La variabilidad morfológica determinó diferencias entre los tipos de guayabo Media China y Sassaoka pero no para Oaxaca y San Cristóbal, que tuvieron mayores similitudes entre sus individuos.

La variación respecto a las huellas de ADN fue baja entre el total de individuos y dentro de los tipos analizados; Media China y San Cristóbal fueron los más variables y Oaxaca el más uniforme.

Los tratamientos deficientes en los micronutrientes evaluados no tuvieron impacto sobre las características morfológicas cuantitativas de las plantas, sin embargo fue posible identificar sus efectos mediante la observación de los síntomas característicos así como establecer algunas tendencias.

Se encontraron varios patrones de ADN relacionados con las deficiencias de los micronutrientes estudiados pero no fueron exclusivos, lo que indica la complejidad en cuanto al número de genes que pudieran estar involucrados en estos procesos, no obstante pueden considerarse como marcadores moleculares para la deficiencia de estos micronutrientes en general.

VII. DISCUSIÓN GENERAL

El guayabo (*Psidium guajava* L.) es una especie originaria del trópico americano con amplia distribución en las regiones tropicales de México. Como segundo productor de guayaba en el mundo las perspectivas del país aún son promisorias (Bourke, 1976; Moncur, 1988; Mitra *et al.*, 2008). Ante el reto que representa mantener y mejorar el sistema de cultivo del guayabo en México, diferentes equipos de investigación se han movilizado para responder a las expectativas de los productores y consumidores, enfocando sus esfuerzos para resolver aspectos técnicos tales como la diversidad varietal, nutrición y el manejo integral de los enemigos naturales de los árboles, dentro de los más urgentes. En este contexto el presente trabajo tuvo lugar.

La colaboración entre especialistas del Colegio de Posgraduados y la Universidad Autónoma Chapingo permitió realizar un estudio descriptivo de la variación morfológica y molecular de diferentes tipos de guayabo de México y relacionar estos resultados con los requerimientos nutrimentales de las plantas. Para dar respuesta a este objetivo, el estudio abordó en primer lugar la distribución ecogeográfica de la especie que junto con la descripción de la variación morfológica y por medio de marcadores moleculares de los materiales colectados, ilustró la estructuración de la variación intraespecífica. Enseguida se estudió la variación de la respuesta de algunos genotipos a los requerimientos nutrimentales. Con ello ahora se tiene información de materiales de interés frutícola que puede servir a productores y mejoradores, información sobre aspectos de nutrición de la planta para fortalecer el manejo en campo y de marcadores que podrían servir como herramientas en el mejoramiento asistido.

7.1 Estructuración de la variación genética y ecogeográfica del guayabo en México

Los resultados derivados del análisis con GIS, respecto a la distribución geográfica potencial del guayabo en México, sugieren que al ser *Psidium guajava* L. una especie tropical, es posible que se le encuentre distribuida a lo largo de todas las zonas donde se desarrolla este tipo de vegetación en el país. De igual manera, es posible que los grupos formados cuenten con un importante grado de variabilidad genética derivada de los procesos de domesticación y diseminación de la especie lo que permitió su adaptación a condiciones ambientales distintas determinadas por regímenes de precipitación, temperaturas y altitud, entre otros. Los grupos menos numerosos (I y II) están adaptados a condiciones muy cálidas (Aw) y a baja altitud y los más numerosos (III y IV) se desarrollan en regiones de cálidas a semicálidas o de transición ((A)C) con mayor altitud. En cuanto a la precipitación, aunque el volumen estimado para todos los escenarios es muy parecido, el régimen de distribución es diferente, principalmente por la presencia de períodos de sequía intraestival evidentes en las condiciones ambientales de los grupos II, III y IV (Figura 6, Capítulo III).

Además de predecir áreas potenciales para el desarrollo de una especie con esta herramienta, la información generada también puede ser de utilidad en trabajos de conservación de recursos fitogenéticos (Eyzaguirre *et al.*, 2005). Al respecto, Rajan *et al.* (2007), señalan que para llevar a cabo el mejoramiento de los cultivos es necesario contar con una reserva de genes que de manera natural está resguardada en la diversidad genética de cada especie. En consecuencia, la identificación y recolección de materiales de guayabo en sus ambientes naturales para utilizarlos en los programas de mejoramiento genético, permitiría la incorporación de características deseables a los que actualmente se producen de manera comercial en México y también se pueden identificar zonas aptas

para su cultivo en las que se podrían establecer nuevos huertos comerciales, con la garantía de contar con un ambiente adecuado para su crecimiento y desarrollo.

Un ejemplo de esto se desarrolla en condiciones ecológicas del suroeste de Sonora, donde se evaluaron 25 materiales de guayabo y se identificaron cinco genotipos con los mejores rendimientos de 10 a 17.5 Kg por árbol con pesos de fruto desde los 18.2 hasta los 142 g. Esta región está reconocida por la USDA como libre de la mosca mexicana de la fruta, lo que le confiere una ventaja comparativa respecto a otras regiones productoras de México. (Samaniego-Russo, *et al.*, 2008). También, se tienen seis selecciones, derivadas de programas de mejoramiento, para introducir tipos tropicales de guayabo con frutos grandes de pulpa rosa-coloreada y pulpa blanca en la región del Bajío (Mondragón-Jacobo, *et al.*, 2008).

Las provincias florísticas de México en donde es posible encontrar recursos genéticos de guayabo en áreas tropicales y subtropicales son: la planicie costera del noroeste, costa del golfo de México y sierra madre oriental, en los estados de Tamaulipas, Nuevo León, San Luis Potosí, Hidalgo, Veracruz y Tabasco; en las provincias de Baja California y planicie costera del noreste en áreas específicas de los estados de Baja California Norte, Sur y Sonora; la provincia de la costa pacífica que cruza por los estados de Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Colima, Jalisco, Nayarit, Sinaloa y Durango; en la provincia de las serranías meridionales, que abarca parte de los estados de Jalisco, Michoacán, Guanajuato, Querétaro, Estado de México, Morelos y Puebla; en la provincia de las serranías transísmicas en Chiapas y en la provincia florística de la península de Yucatán integrada por los estados de Yucatán, Campeche y Quintana Roo. Cabe señalar que en la mayoría de los estados incluidos en la distribución

encontrada, ya existen huertos establecidos con fines comerciales y varios de ellos son de los mayores productores del país (Cuadro 4, Capítulo II).

En la búsqueda de este recurso fitogenético y de acuerdo con la distribución potencial del guayabo en México analizada en este trabajo, faltan por explorar las zonas tropicales y subtropicales de las provincias florísticas en el límite entre la planicie costera del noreste y Baja California, la costa pacífica y la planicie costera del noroeste.

Respecto a la caracterización morfológica de las accesiones de guayabo realizada en esta investigación, se identificó variación que fue integrada en 3 grupos con características bien definidas en la planta, hoja y principalmente en fruto que se pueden aprovechar en los programas de mejoramiento genético.

La variabilidad morfológica en guayabo también se ha observado en otros países. En Venezuela con 26 descriptores UPOV, se caracterizaron 100 accesiones colectadas en un intervalo de altitud de 0 a 2000 m.s.n.m. provenientes de en una gran variedad de zonas ecológicas asociadas, en su mayoría, con asentamientos humanos. Los caracteres más variables fueron los relacionados con el fruto: número de semillas, color del fruto y pulpa. Los patrones de distribución de semillas en algunas regiones muestran más abundancia o variabilidad de fenotipos, lo que puede estar relacionado con las características reproductivas de *P. guajava*, interacciones bióticas, ambientales y factores antropomórficos (Aranguren *et al.*, 2008b). En Brasil, se realizó una colecta y caracterización de germoplasma de dos especies de *Psidium*, guayabo (119 accesiones) y arazá (40 accesiones), de 35 diferentes ecorregiones, basada en una zonificación eco-geográfica y mapas de vegetación. Los descriptores morfológicos más variables para ambas especies fueron el color de brote, pubescencia en el envés de la hoja, largo y ancho de la hoja, patrón de

nervaduras, superficie del fruto, crestas y surcos longitudinales del fruto y colores de pulpa de fruto (Fernandes-Santos *et al.*, 2008).

Los resultados de la evaluación de las accesiones de esta investigación respecto a sus patrones de ADN, indican que la variabilidad en general es importante. No obstante, se observó la tendencia de agrupamiento en relación a las provincias florísticas donde se colectaron de tal manera que los materiales más variables provienen de la costa del golfo de México, serranías transísmicas y península de Yucatán, los menos variables provienen de ambientes más específicos, un grupo de la serranías transísmicas y península de Yucatán, otro de las serranías meridionales y altiplanicie y uno más de serranías meridionales, altiplanicie y serranías transísmicas. Los grupos con variabilidad intermedia incluyen materiales colectados en la costa del Golfo de México, sierra madre oriental y serranías meridionales.

Esta tendencia se ha observado en estudios realizados tanto en México como en otros países. Tapia (2006), en una investigación realizada con marcadores RAPD en accesiones de guayabo provenientes de Nayarit, Chiapas, Morelos, Zacatecas, Michoacán, Tamaulipas, Veracruz y Brasil observó agrupamientos respecto al lugar de origen. Sánchez-Teyer *et al.* (2008), evaluaron la variabilidad de 73 accesiones de guayabo de diferentes partes del centro y norte de México con marcadores SSR y AFLP y observaron 5 diferentes grupos con separaciones entre las regiones de procedencia. Aranguren *et al.* (2008a), caracterizaron 31 accesiones de guayabo de diferentes regiones de Venezuela con microsatélites específicos para esta especie y se encontró asociación con su distribución geográfica.

En general, tanto en México como en otros países, la variabilidad observada con marcadores moleculares RAPD para esta especie es importante. Hernández

et al. (2003), encontraron una amplia variabilidad genética en árboles de guayabo dentro y entre plantaciones de Calvillo, Aguascalientes, al igual que Domínguez (2004), en accesiones de guayabo 'Media china' provenientes de plantaciones de los municipios de Juárez y Zitácuaro Michoacán. Sharma *et al.* (2007) evaluaron la variación genética entre 22 genotipos de la India, de cultivares de *Psidium guajava* L. y dos especies *P. catteilianum* y *friedrichthalianum* con 31 decámetros aleatorios RAPD. Encontraron 376 bandas con 92.29% de polimorfismo, en un rango de 1200-2200 pb. Se encontró similitud genética entre 0.33 y 0.94, los valores extremos se presentaron entre cultivares de *P. guajava* y se formaron dos grupos, uno con 3 individuos de *P. guajava* y *catteilianum* y otro con los 19 restantes. A diferencia de lo observado en esta investigación, ellos encontraron mayores polimorfismos con los iniciadores OPB-02, OPB-05, OPB-12, OPB-15, OPB-19.

En investigaciones más avanzadas en guayabo se han utilizado marcadores moleculares más específicos. Rodríguez *et al.* (2007), utilizaron marcadores SSR de ADN para establecer relaciones filogenéticas en accesiones de guayabo de una colección de germoplasma en Cuba. Con marcadores AFLP integraron mapas de ligamiento en poblaciones derivadas de cruza en el cultivar 'Enana roja cubana', con 220 marcadores dentro de 11 grupos de ligamiento que representan los 11 cromosomas de la especie, con un tamaño del genoma de 1379 cM. Mediante un análisis de QTL para características vegetativas y de fruto, identificaron 15 loci que contribuyen al largo y ancho de la hoja, longitud del pecíolo, diámetro y altura de la planta y en fruto, peso, acidez, sólidos solubles totales, contenido de vitamina C y grosor de pulpa. Saxena *et al.* (2007), utilizaron seis microsatélites para discriminar genotipos de guayabo estrechamente relacionados y establecer su relación con las especies *P. acutángula* y *P. guinense*. Encontraron una distancia estrecha en la descendencia de *P. guajava* y una distancia considerable entre ésta y las otras dos especies en

estudio. Billiote *et al.* (2008), señalan que los marcadores moleculares se han utilizado en cultivos tropicales, especialmente en especies perennes con largos ciclos generativos y que a menudo permiten seleccionar el material para mejoramiento genético en etapas tempranas.

Es importante destacar el esfuerzo que se realiza actualmente con el proyecto multinacional GUAVAMAP, dirigido por la Comisión Europea, que pretende mejorar la utilización del guayabo, con la participación de laboratorios de España, Francia y Alemania e instituciones de países productores como Brasil, Venezuela, México y Cuba, para la identificación y caracterización de nuevos genotipos de guayabo y su utilización en programas de mejoramiento acordes a las necesidades de cada país, el establecimiento de mapas de ligamientos moleculares con la ayuda de microsatélites, mapeo con QTL para características agronómicas importantes y selección asistida por marcadores (Rhode, 2008).

7.2 Variación genética y deficiencias de micronutrientos

Respecto a la caracterización morfológica de las plantas evaluadas en el experimento de nutrición, las más grandes y con mayor variación entre sí, fueron las de los genotipos Media China y Sassaoka, por el contrario, las de Oaxaca y San Cristóbal fueron más parecidas entre sí, con mayor uniformidad y de menor tamaño. Las características más contrastantes entre los genotipos se engloban en la forma de la hoja y ápices radicales, peso y tamaño de la planta y la presencia de coloración por antocianinas. Algunos autores señalan que la presencia de antocianinas es común en especies de plantas tropicales, principalmente en hojas en crecimiento, y tienen como función protegerlas contra daños por rayos ultravioleta, hongos patógenos y radicales libres (Lee y Collins, 2001; Coley y Aide, 1989). Específicamente, en las plantas estudiadas, la

presencia de estos compuestos se observó en los brotes de hojas nuevas ubicadas en las ramas superiores.

El germoplasma de 'Media china' que se cultiva en el área semiárida del país, ha sido propagado asexualmente y cubre el 90% del área plantada con guayabo, sus frutos son de tamaño medio a pequeño, con pulpa crema coloreada y dulce, excelente aroma, de medio a alto contenido de semillas, con árboles de alta productividad y adaptados a ambientes subtropicales semiáridos y prácticas de producción estacionales (Mondragón-Jacobo *et al.*, 2008).

Sassaoka es una de las principales variedades comerciales que se cultiva en Brasil, se caracteriza por tener plantas vigorosas, productivas y de crecimiento vertical, de frutos grandes, redondos y con cáscara arrugada. La pulpa es de color rosa claro, firme y con pocas semillas (Rebouças *et al.*, 2003).

En cuanto a la caracterización molecular, los genotipos Oaxaca y San Cristóbal son los más parecidos entre sí, y en un segundo nivel de similitud se agrupan con Media China, no obstante Sassaoka se mantiene separado de los tres, lo que podría estar relacionado con el origen de los materiales, ya que los primeros tres son de México mientras que este último es procedente de Brasil, de alguna manera los procesos de selección que el material haya recibido ya sea de manera natural o artificial, han influido en su variabilidad. Por otro lado, resalta que tanto el análisis morfológico como el molecular indican la similitud entre los genotipos Oaxaca y San Cristóbal, lo que sugiere que los materiales originales probablemente se hayan colectado en la misma región o en regiones muy cercanas, de tal manera que comparten una porción importante de su información genética.

Los efectos de los tratamientos sobre las plantas se reflejaron en las características cuantitativas evaluadas. En el caso de las plantas deficientes en Fe, el área foliar y los incrementos en altura y diámetro a primera rama tuvieron los máximos valores. Las plantas deficientes en B, tuvieron los mayores valores de peso fresco y seco de tallo, altura de planta, peso fresco y seco de raíz así como el ángulo y ancho de los ápices radicales, lo que sugiere que fueron las de mayor tamaño, densidad y con los ápices radicales más gruesos. Las plantas deficientes en cobre presentaron los mayores valores de Longitud de hojas del último entrenudo, Incremento en altura de la planta y a Primera rama, Incremento en diámetro de tallo, así como los mayores Índices de biomasa fresca y seca. Lo anterior se relaciona con el alargamiento observado en las hojas y tallos de las plantas. Las plantas deficientes en manganeso, tuvieron los valores mayores de diámetro de rama al tercer par de hojas, incremento en altura, así como número y peso seco de ápices radicales. Las plantas deficientes en zinc, presentaron los menores valores de área foliar, peso fresco y seco de tallo, peso fresco y seco de raíz y ancho de ápices radicales, por lo que fueron las plantas que menor crecimiento y desarrollo mostraron.

En la planta de guayabo, los niveles de nitrógeno, fósforo, potasio, zinc y cobre disminuyen en la medida que la hoja aumenta de edad y los de calcio, magnesio, sodio y manganeso se incrementan. En esta especie, los niveles de N, Ca y Mg son altos en las hojas de la base de la rama y disminuyen hacia las hojas terminales, mientras que lo inverso se observa para P, K, Na, Zn y Mn. La estabilización de los nutrimentos se observa alrededor de los cinco meses de edad de la hoja. Para el muestreo foliar del guayabo se debe tomar un par de hojas ubicadas entre el tercero y quinto nudo a partir del ápice, una vez que se ha cosechado. Es posible que exista un antagonismo entre el K, Ca y Mg, ya que al disminuir el contenido foliar del K, tiende a aumentar el del calcio y en menor grado el magnesio cuando el crecimiento vegetativo y reproductivo

ocurren de manera simultánea. Los bajos niveles de potasio se pueden atribuir a su movilización hacia ramas fructíferas ya que se requiere en la producción de frutos. Los niveles de N, P, y K en plantas de guayabo, son más altos en las terminales fructíferas por su movilización para la producción de frutos (Guerra y Bautista, 2002).

Al guayabo se le puede encontrar creciendo en suelos con un rango de pH de 5.5 a 8.0. Valores de conductividad eléctrica alrededor de 2.0 (d.Sm⁻¹) tienen efectos negativos sobre la disponibilidad de nutrientes como el P, Mn, Zn y B. En suelos con un pH bajo, las plantas presentan un broceado en las hojas por deficiencias de P, K y Zn. Es por ello que la selección adecuada del suelo para el cultivo de este frutal es esencial para tener una óptima producción y una efectiva utilización de los recursos (Singh y Singh, 2007).

La clorosis por deficiencia de hierro, se presenta en suelos calcáreos con pH elevado y alta concentración de bicarbonatos. Las plantas han desarrollado diferentes mecanismos de adaptación a la deficiencia de hierro, como el uso de aminoácidos no proteícos llamados fitosideróforos que son efectivos en la inmovilización del Fe⁺³ de suelos calcáreos. Estos compuestos se localizan en las raíces e indican la tolerancia de diferentes especies y genotipos a esta deficiencia (Shen *et al.*, 2002). En el caso del zinc, su deficiencia es común en suelos jóvenes de origen volcánico en regiones de laderas, en tierras agrícolas y en suelos calcáreos, sin embargo, en la variabilidad de las plantas pueden identificarse genotipos que hayan desarrollado tolerancia a esta deficiencia. En general, la selección sistemática en los programas de mejoramiento puede ser una herramienta potencial para mejorar el cultivo de especies adaptadas a estas condiciones (Malakouti, 2001; Knight *et al.*, 2004).

Los síntomas observados en las plantas coinciden con los reportados para guayabo por otros autores, incluso para los elementos mayores (Singh y Singh, 2007). Adicionalmente, en este trabajo se observó para manganeso clorosis intervenal difusa (moteado) sobre las hojas en crecimiento, síntoma que coincide con lo documentado por Barker y Pilbeam (2007) para esta deficiencia nutrimental. De manera similar, en las plantas sometidas a deficiencia de cobre, se observó un alargamiento de las hojas y tallos jóvenes, lo que se relaciona con la pérdida de lignificación en los tallos documentada por Marschner (2002) para esta deficiencia.

Al comparar los contenidos de micronutrientes en los tratamientos deficientes con los reportados por otros autores, sólo en el caso de Zn y B se ubican por debajo del rango de deficiencia, Fe y Cu se ubican en el de suficiencia y Mn en el de exceso (Singh y Singh, 2007). Es posible que este comportamiento, esté relacionado con el movimiento de los elementos nutritivos de las zonas fuente de la planta hacia las de demanda, ya que las hojas destinadas al análisis de tejido foliar, se tomaron del tercer par (contados del ápice hacia la base de la rama), sitio indicado por algunos autores como de mayor estabilidad de los nutrientes (Sydney, 1986), no obstante está muy cercano a las zonas de crecimiento por lo que probablemente, a pesar de que la planta presentó los síntomas de deficiencia del tratamiento correspondiente, el micronutriente en cuestión estaba presente en las hojas que se analizaron. En trabajos realizados en guayabo respecto a la posición de las hojas sobre la rama, se encontró que los contenidos de N, Ca, y Mg incrementan de la base a la punta y por el contrario, P, K, Na, Zn y Mn disminuyen, en el caso del Cu no se observó tendencia alguna (Mitra, 1988).

Al respecto, se ha establecido la importancia de reconocer que los patrones de transporte en la planta no son casuales sino altamente direccionales, que

existen relaciones bien definidas entre las zonas fuente y demanda con el transporte y dirección de los nutrimentos y que además parecen estar bajo un control preciso (Bidwell, 1990). Los mecanismos propuestos para explicar las variaciones genéticas que justifican el comportamiento de las plantas eficientes o no frente a un estrés nutrimental se agrupan en las siguientes categorías: a) Modificación de la absorción radicular, por cambios en la morfología de la raíz o del mecanismo de absorción y transporte de iones. b) Cambios en la utilización de nutrientes en el metabolismo y el crecimiento. c) Capacidad de sustituir un elemento por otro. d) Alteración del movimiento de los nutrientes a través de las raíces, de su liberación al xilema y también de su distribución en la parte aérea. Así, en casos de deficiencia, una capacidad elevada de redistribución desde las hojas, partes senescentes u organelos celulares hacia las zonas de crecimiento de plantas eficientes sería muy importante para la supervivencia frente a otras ineficientes, de baja capacidad distributiva (Azcón-Bieto y Talón, 2003).

La asociación de las bandas con las deficiencias de los micronutrimentos observadas en esta investigación, en la mayoría de los casos, no es exclusiva. La banda 7 del iniciador B1 se asocia con las deficiencias de B, Cu, Fe, Mn y Zn y la banda 13 del mismo iniciador con las deficiencias de Fe, Mn y Zn. Las siguientes bandas se asocian en menor proporción con las deficiencias que a continuación se indican: B1-1 y B1-3 con Cu, Fe y Zn; B1-2 y B1-6 con Cu y Fe; B1-5 con Zn y Fe; B5-2 con Cu y B; B1-11 y B17-1 con Fe y Mn; B5-1 y B17-13 con Fe y por último B5-6 y B14-1 con Cu.

Se tienen reportes sobre las interacciones entre algunos de los micronutrimentos estudiados en este trabajo, por ejemplo, elevadas concentraciones de Cu, Zn y Mn pueden inhibir la clorosis férrica; la deficiencia de Fe estimula la asimilación del Cu; el exceso de Cu inhibe significativamente la disponibilidad del Zn y viceversa; el Zn interviene en los procesos de

absorción del Cu; el Cu estimula la asimilación del manganeso; altas concentraciones de Zn disminuyen la toxicidad por B (Barker y Pilbeam, 2007). Estos comportamientos de los micronutrientes en la planta pueden ayudar a explicar el porqué los polimorfismos encontrados con los marcadores RAPD en este trabajo no se asocian de manera única con una deficiencia ya que es posible que los mecanismos celulares sean de mayor complejidad, de tal manera que se requieran técnicas moleculares más específicas para rastrear las regiones del ADN donde esté almacenada la información que los regula.

7.3 Perspectivas para la conservación y utilización del guayabo en México

La preocupación por la uniformidad genética presente en huertos comerciales de guayabo no sólo se limita a México, donde el germoplasma cultivado 'Media china', es muy similar en las principales áreas productoras (Padilla-Ramírez *et al.*, 2008). En Cuba ha sido limitada la selección e introducción de genotipos con características agronómicas importantes y no se tienen estudios enfocados a la identificación de progenitores potenciales para programas de mejoramiento (Valdés-Infante *et al.*, 2008). Los huertos comerciales de guayabo en Venezuela, se establecieron con algunas variedades importadas desde hace 40 años (Aranguren *et al.*, 2008b). Sin embargo se destaca que al guayabo se le puede encontrar como un cultivo nativo en muchas partes lo que facilita la colecta, caracterización y uso de materiales sobresalientes con ventajas comparativas como tamaño de fruto y forma, color interno y externo, número de semillas, grosor de pulpa, vitamina C, entre otras (Padilla-Ramírez *et al.*, 2008).

Sánchez-Teyer *et al.* (2008), manifiestan que el guayabo mexicano como recurso fitogenético, requiere de un análisis profundo y detallado para determinar el nivel de variabilidad genética para su manejo y conservación. Es aquí donde la conservación *ex situ* de colecciones de germoplasma puede jugar

un papel importante en el mejoramiento genético de la especie, estrategia que ya se sigue por investigadores tanto de México como de otros países. Padilla-Ramírez *et al.* (2008), mantienen una colección de germoplasma con la finalidad de incrementar la base genética del guayabo en México. En Cuba se caracterizó un banco de germoplasma de guayabo mediante marcadores SSR para la identificación de accesiones con acervo de genes importantes (Valdés-Infante *et al.*, 2008). Recientemente en Venezuela, se estableció un banco de germoplasma de guayabo (100 accesiones) y otras mirtáceas (58 accesiones), que ayudará a la detección de genes de interés para programas de mejoramiento genético apoyados con marcadores moleculares y técnicas de cultivo *in vitro*. La colección incluye muestras de herbario, semillas, ADN e información sobre el lugar de origen (Valecillos *et al.*, 2008). En Malasia, se realizó una colección de germoplasma para incrementar la base genética del guayabo para trabajos de mejoramiento, especialmente en la búsqueda de resistencia a nematodos noduladores de la raíz (Milan, 2008).

En este sentido y con base en la variabilidad observada en la colección de guayabo evaluada en la presente investigación, se sugiere el establecimiento de un banco de germoplasma en la región sureste del país, en donde instituciones como la Universidad Autónoma Chapingo o el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias podrían participar en la gestión de la infraestructura necesaria para este fin.

Otra opción interesante, podría ser la conservación *in situ* del guayabo en México, teniendo en cuenta la evidencia del presente trabajo donde se encontró que las zonas de mayor variación son la costa del golfo de México, serranías transísmicas y península de Yucatán, además de que en estas regiones es posible que se encuentren especies silvestres relacionadas como *P. sartorianum* y *P. guineense* con quienes se desconoce si existe flujo de genes. Este tipo de gestión

implica una investigación participativa entre agricultores, consumidores, agrónomos, botánicos y genetistas, que difícilmente puede ser sustentada por las propias comunidades, por lo que estas acciones sin duda deben de estar apoyadas por financiamientos de organismos nacionales como SINAREFI o CONABIO en el marco de la conservación de los recursos genéticos del país.

VIII. CONCLUSIONES GENERALES

El estudio de la distribución potencial del guayabo en México, permitió identificar una variación eco-climática entre cuatro áreas de distribución probable, en ambientes delimitados por la altitud, regímenes de precipitación pluvial y temperatura, en los climas tropical, subtropical y semicálido.

Los mapas de distribución del guayabo en el país, ponen en evidencia que la mayor probabilidad de encontrar estos recursos fitogenéticos coincide con las regiones donde se desarrolla vegetación tropical de manera natural en a la península de Yucatán, costa del golfo de México, serranías meridionales y límites con la altiplanicie, por lo que estas regiones deberán ser prioritarias para siguientes colectas.

Las modificaciones realizadas a los protocolos evaluados, fueron acertadas para lograr la extracción de ADN de hojas frescas y secas de guayabo en cantidad y calidad suficiente para realizar los procesos de PCR y se recomienda el método propuesto para procesar muestras provenientes de herbarios y de recolectas en campo.

La variación morfológica detectada en las accesiones permitió la integración de tres grupos con características contrastantes en cuanto a la forma, peso y tamaño del fruto, grosor de pulpa, contenido de sólidos solubles y cantidad de semilla principalmente. En el grupo I, los frutos son redondos con el menor tamaño, peso y grosor de pulpa, de dulzor intermedio y con muchas semillas

pequeñas. En el grupo II, los frutos son medianos y muy dulces, alargados y con semillas medianas. En el grupo III, los frutos son grandes, menos dulces, alargados con mucha pulpa y semillas grandes.

Estos grupos pueden servir de base para un mejoramiento planeado de la especie que derive en la generación de líneas o selecciones con características específicas para el consumo en fresco o para la industria alimentaria diferentes a las que se comercializan en la actualidad y que podrían ser atractivas para los productores en campo.

Los genotipos más variables respecto a sus patrones de ADN, provienen de la costa del golfo de México, serranías transísmicas y península de Yucatán, los menos variables de ambientes específicos de las serranías transísmicas, península de Yucatán, serranías meridionales y altiplanicie y los de variabilidad intermedia de la costa del golfo de México, sierra madre oriental y serranías meridionales. Esta información puede ser de utilidad para la ubicación de futuros sitios de recolecta para fines de mejoramiento genético o para la conservación de colecciones o bancos de germoplasma de la especie.

La variabilidad morfológica determinó diferencias entre los genotipos Media China y Sassaoka pero no para Oaxaca y San Cristóbal, que tuvieron mayores similitudes entre y dentro de sí, por lo que tienden a ser uniformes.

La variación respecto a las huellas de ADN fue baja entre el total de individuos y dentro de los genotipos analizados; Media China y San Cristóbal fueron los más variables y Oaxaca el más uniforme.

Los tratamientos deficientes en los micronutrientes evaluados no tuvieron impacto sobre las características morfológicas cuantitativas de las plantas, no

obstante fue posible identificar sus efectos mediante la observación de los síntomas característicos así como establecer algunas tendencias.

Se encontraron varios patrones y bandas de RAPD relacionados con las deficiencias de los micronutrientes estudiados. Estas bandas no fueron exclusivas de una deficiencia pero podrían considerarse como buenas candidatas de marcadores de deficiencias de micronutrientes en general. Lo anterior indica la complejidad en cuanto al número de genes que pudiera estar involucrados en estos procesos y la necesidad de contar con generaciones de mejoramiento avanzadas para confirmarlos.

Los resultados presentados permiten distinguir nuevas estrategias para una gestión racional de los recursos genéticos del guayabo en México y también se abren vías de uso racional de la variación para el mejoramiento genético. Las investigaciones sobre los recursos genéticos de la guayaba y silvestres relacionados continúan en la UACH, el CP, el INIFAP y el CICY, y el estudio de nuevas colectas del sur del país así como introducciones de material de Sudamérica (Brasil principalmente) permitirá, seguramente, enriquecer las conclusiones obtenidas con la presente tesis.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadía J., A. Álvarez- Fernández, F. Morales, M. Sanz and A. Abadía. 2002. Correction of iron chlorosis by foliar sprays. Proceedings of the International Symposium on Foliar Nutrition. Eds. M. Tagliavini. ISHS. Acta Horticulture 594: 115-121.
- Adams, D., J. Kim, R. J. Beta, L. Marcus, D. E. Slice, J. Walker. 2004. NTSYSpc. 2.2 Applied Biostatistics, Inc. New York USA.
- Ahrens U., Seemueller E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organism by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
- Aranguren Y., A. Briceño and G. Fermin. 2008a. Assessment of the variability of venezuelan guava landraces by microsatellites. *In: Abstracts of the 2nd International Symposium on Guava and Other Myrtaceae*. Eds: W. Rhode and G. Fermin. México. pp: 57.
- Aranguren Y., C. Vallecillos and G. Fermin. 2008b. Variability of venezuelan landraces of guava by phenotypic markers and geographical origin. *In: Abstracts of the 2nd International Symposium on Guava and Other Myrtaceae*. Eds: W. Rhode and G. Fermin. México. pp: 58.
- Arima H. and G. Danno. 2002. Note: Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 66(8): 1727-1730.
- Azcón-Bieto, J. y M. Talón. 2003. Fundamentos de fisiología vegetal. Edit. McGraw-Hill Interamericana. pp: 83-130.
- Barker, A. V. and D. J. Pilbeam .2007. Handbook of plant nutrition. RCR Press Taylor & Francis Group, LLC. USA. 614 p.

- Bidwell, R., G. S. 2002. Fisiología vegetal. Capítulo 13, Transporte. AGT Editor S.A. pp: 327-348.
- Billiote N., A. H. Risterucci, L. Baudouin, M. Seguin, V. Pujade-Renaud, M. Ruiz, C. Lanaud, E. Guiderdoni, E. Ritter and W. Rhode. 2008. DNA markers for the analysis of tropical crop plants. *In: Abstracts of the 2nd International Symposium on Guava and Other Myrtaceae*. Eds: W. Rhode and G. Fermin. México. pp:14.
- Bloom, M. V. and D. A. Micklos. 1996. Laboratory DNA Science. An introduction to recombinant DNA techniques and methods of genome analysis. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Canada. 434 P.
- Bourke, O. D. D. 1976. *Psidium guajava* L. - Guava. *In: The propagation of tropical fruit trees*. Garner, R.J. and Chaudhri, S.A. (eds.). Commonwealth Bureau of Horticulture and Plantation Crops. Slough, UK. Horticultural Review No. 4. pp: 530-553.
- Castillo T. R. O. 1996. La biotecnología en la conservación y usos de la agrobiodiversidad. INIAP. 6: 5-17.
- Chandler, W. H. 1962. Frutales de hoja Perenne. Unión Gráfica S.A. México. pp: 408-411.
- Chiu-Lan H., Yuh-Charn L., Gow-Chin Y. and Hui-Yin C. 2007. Preventive effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaves and its active compounds against α -dicarbonyl compounds-induced blood coagulation. Food Chemistry 103(2): 528-535.
- CEDEMUN. 2000. Enciclopedia de los municipios de México. Secretaría de Gobernación. Tomos del I al IX. Versión electrónica.
- CETENAL- UNAM. 1970. Instituto de Geografía. Cartas de clima, escala 1:500,000.
- Codex Alimentarius. 1999. Norma del para la Guayaba. CODEX STAN 215. 6 p.

- Coley P. D. and T. M. Aide. 1989. Red coloration of tropical young leaves: a posible antifungal defence. *Journal of Tropical Ecology* 5(3): 293-300.
- CONABIO. 2005. Red Mundial de Información Sobre Biodiversidad-Especímenes. http://www.conabio.gob.mx/remib/cgi-bin/remib_distribucion.cgi
<http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/remibnodosdb.html>
- Concepción, O. V. 2007. Organogénesis y embriogénesis somática in vitro en el guayabo (*Psidium guajava* L.) cv. Enana Roja Cubana. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Ciego de Ávila. Centro de Bioplantás. Cuba. 114 p.
- De la Cruz M., F. Ramírez and H. Hernández. 1997. DNA isolation and amplification from cacti. *Plant Molecular Biology Reporter* 15: 319-325.
- De Oliveira, S. A. 1978. La influencia del boro en el crecimiento y nutrición mineral del *Phaseolus vulgaris* L. Tesis de Maestría en Ciencias. Rama de Suelos. Colegio de Postgraduados. México. pp: 21-24.
- Dobzhansky, T. 1970. *Genetics of the evolutionary process*. Columbia University Press. New, York, USA. 505 p.
- Domínguez, A., J. L. 2004. Variabilidad genética, morfológica y fisiológica del guayabo (*Psidium guajava* L.) 'Media china' sometido a deficiencias nutrimentales. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Chapingo. 97 p.
- Domínguez-Álvarez J. L., J. P. Legaria-Solano, R. Nieto-Ángel, A. F. Barrientos-Priego, J. Pineda-Pineda. 2005. Variabilidad genética según RAPD de árboles de guayabo 'Media china' procedentes de cuatro plantaciones y su respuesta morfológica a baja disponibilidad de nutrientes. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11(2): 329-343.
- Eyzaguirre P., D. Cooper, B. Burlingame. 2005. La biodiversidad al servicio de la nutrición y la salud. *Boletín de las Américas* 11(1): 1-2.
- Fairbanks D. J. 2000. Development of genetic resistance to iron-deficiency chlorosis in soybean. *Journal of plant nutrition* 23(11&12): 1903-1913.

- Fernandes-Santos C. A., J. M. Cunha-Castro, F. de França-Souza, A. Alcântara-Vilarinho, F. R. do Ferreira, J. Gomes-Pádua, R. M. Estigarribia-Borges, R. L. Barbieri, A. d. G. Claret de Souza and M. Amorim-Rodrigues. 2008. Prospecting and morphological characterization of brazilian *Psidium* germplasm. In: Abstracts of the 2nd International Symposium on Guava and Other Myrtaceae. Eds: W. Rhode and G. Fermin. México. pp: 20-21.
- Ferrão, J. M. 1992. A aventura das plantas e os Descubrimientos Portugueses. Instituto de Investigação Científica Tropical. Lisbon, Portugal. 241 p.
- Gaceta del Senado Mexicano. 2007. No. 118. Consultado el 25 de enero del 2009 en la siguiente dirección:
<http://www.senado.gob.mx/gace.php?sesion=2007/09/20/1&documento=44>
- García, E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen, para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. 246 p.
- Gárete, A. y D. Bonilla 2000. Nutrición mineral y producción vegetal. In: Fundamentos de fisiología vegetal. Azcón D. J; Talón. M. (eds). Editorial McGraw-Hill. Madrid, España. pp: 83-97.
- Ghasemi-Fasaei R., A. Ronaghi, M. Maftoun, N. Karimian and P. N. Soltanpour. 2003. Influence of FeEDDHA on iron-manganese interaction in soybean genotypes in a calcareous soil. Journal of Plant Nutrition 26 (9): 1815-1823.
- Grasa R., I. Clavería, M. P. Paniagua, J. Abadía y A. Abadía. 2006. Impact of iron chlorosis on macro-and micro- nutrient budgest in peach. Proceedings of the International Symposium on Mineral Nutrition of Fruit Plants. Eds. J. B. Retamales and G. A. Lobos. ISHS. Acta Horticulture 721: 99-104.
- Guerra E. y D. Bautista. 2002. Contenido foliar de elementos nutricionales en tres clones de guayaba (*Psidium guajava* L.) en época de alta actividad de crecimiento. Bioagro 14(2): 99-104.

- Google Earth. 2005. <http://earth.google.com>. La versión 5.0 fue consultada por última vez en enero del 2009.
- Gonzaga, N., S. J. Monteiro. 1994. Goiaba par exportação: aspectos técnicos da produção. Ministerio de Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agraria, Secretaria de Desenvolvimento Rural, Programa de Apoio á Produção e Exportação de Frutas, Hortalizas, Flores e Plantas Ornamentais. EMBRAPASPI: D. F., Brasilia, Brazil. 49 p.
- González, G. E., J. S. Padilla, L. Reyes M., M. A. Perales, F. Esquivel. 2002. Guayaba, su cultivo en México. Libro técnico No.1. INIFAP. Pabellón Aguascalientes México. 182 p.
- Gupta U. C. 2007. Boron. In: Handbook of plant nutrition. Eds. Barker, A. V. and D. J. Pilbeam. RCR Press Taylor & Francis Group, LLC. USA. pp: 239-278.
- Gutiérrez G., Y. I., M. Martínez M., O. Bilbao R., J. de la Paz N. y L. E. Rodríguez R. 2000. Suspensión oral antidiarreica de *Psidium guajava* L. Revista Cubana de Farmacología 34(1): 44-49.
- Guzzy, A., M.T. 1986. Etnobotánica de *Psidium guajava* L. "guayaba". Tesis de Licenciatura. Facultad de ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico city, Mexico. 130 p.
- Harborne, J. B. 1991. Phytochemical Methods. Editorial Chapman and Hall. Second Edition. pp: 37-89.
- Harris D. R. 1967. New light on plant domestication and the origins of agriculture: A review. American Geographical Society. Geographical Review 57(1): 90-107.
- Hernández D., S., J. Martínez, J. S. Padilla, N. Mayek. 2003. Diversidad genética de *Psidium spp* en la región Calvillo-Cañones, México. In: Padilla, R. J. S., L. Reyes M., E. González G. Y M. A. Perales de la C. (Eds.). Memoria. Primer Simposium Internacional de la Guayaba. Aguascalientes, México. Diciembre del 2003. pp: 71-83.

- Hidalgo, R. 2003. Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. *In: Franco, T. L. e Hidalgo, R. (eds.). 2003. Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico no. 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. pp: 2-26 .*
- Hogland D. R., D. I. Arnon. 1938. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agric. Ext. Publi. 347: 35-37.*
- Huang C., S. J. Barker, P. Langridge, F. W. Smith and R. D. Graham. 2000. Zinc deficiency up-regulates expression of high-affinity phosphate transporter genes in both phosphate-sufficient and -deficient barley roots. *Plant Physiology 124: 415-422.*
- Humphries, J. M., J. C. R. Stangoulis and R. D. Graham. 2007. Manganese. *In: Handbook of plant nutrition. Eds. Barker, A. V. and D. J. Pilbeam. RCR Press Taylor & Francis Group, LLC. USA. pp: 351-374.*
- Hutchinson, J. 1979. The families of flowering plants. Oxford at the clarendon Press. London. pp: 372-374.
- IG-UNAM. 1992. Sistemas de Información Geográfica. Cartas de Vegetación Potencial IV.8.2, Climas IV.4.10 y Geografía I. Escala 1:4,000,000. Carta de Divisiones Florísticas IV.8.3, escala 1:8,000,000. Instituto de Geografía de la UNAM. México.
- INEGI. 1998. Síntesis geográfica, nomenclatura y anexo cartográfico del Estado de Veracruz. México. 69 p.
- Jarvis D., Hodgkin T., Eyzaguirre P., Ayad G., Sthapit B. and Guarino L. 1997. Farmer selection, natural selection and crop genetic diversity: the need for a basic dataset. *In: Jarvis D. I. and Hodgkin T. Eds. Strengthening the scientific basis of in situ conservation of agricultural biodiversity on-farm. Options for data collecting and analysis. Proceedings of a workshop. 25-29 Agust. Rome, Italy. pp: 1-8.*

- Jones, P. G. and Gladkov, A. 1999. FloraMap Versión 1.0. A computer tool for predicting the distribution of plants and other organisms in the wild. CD-ROM. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia.
- Jones, P.G., Guarino, L and Jarvis, A. 2002. Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data: 2. Floramap. Plant Gen. Resour. Newsletters 130: 1-6.
- Knight J. D., D. Gangotena, D. L. Allan and C. J. Rosen. 2004. Screening common vean genotypes for tolerance to low zinc availability using a chelate-buffered hydroponics system. Journal of Plant Nutrition 27(2): 275-293.
- Kenneth J. S., A. Litt; M. L. Zjhra, J. C. Pires. 2004. Clades, clocks snd continents: historical and biogeographical analysis of myrtaceae, vochysiaceae, and relatives in the southern hemisphere. International Journal of Plant Sciences 165(4): S85-S105.
- Kopsell, D. E. y D. A. Kopsell. 2007. Copper. *In*: Handbook of plant nutrition. Eds. Barker, A. V. and D. J. Pilbeam. RCR Press Taylor & Francis Group, LLC. USA. pp: 293-328.
- Krishnamurthy, L. y Sahagún C. J. 1991. Recursos fitogenéticos. Su conservación para un desarrollo sostenible. Universidad Autónoma Chapingo. 106 p.
- Lee D. W. and T. M. Collins. 2001. Phylogenetic and ontogenetic influences on the distribution of anthocyanins and betacyanins in leaves of tropical plants. International Journal of Plant Sciences 162(5): 1141-1153.
- Lee I. M., Hammond, R., and Gunderson-Rindal, D. E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. Phytopathology 83: 834-842.
- León, J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José. Costa Rica. pp: 357-359.
- Liang Q., Quian H. and Yao W. 2005. Identification of flavonoids and their glycosides by high performance liquid chromatography with electrospray

- ionization mass spectrometry and with diode array ultraviolet detection. *European journal of mass spectrometry* (Chichester, England) 11(1): 93-101.
- Luis A., A., M. R. Mendoza L. y J. Mena C. 2003. Comportamiento del guayabo en la región oriente de Michoacán. *In: Padilla, R.J.S., L. Reyes M., E. González G. y M. A. Perales de la C. (Eds.). Memoria. Primer Simposio Internacional de la Guayaba. Aguascalientes, México. pp: 124-146.*
- Malakouti M. J. 2001. The effects of balanced fertilization and zinc application on improving Apple yield, quality, and reducing browning incidence. *Proceedings of the IV International on Mineral Nutrition in Fruit. Eds. D. and G. Neilsen, Fallahi and Peryea. ISHS Acta Horticulturae 564: 153-158.*
- Manica, I. 2000. Taxonomía de goiabeira. *In: Fruticultura y tropical, goiaba. Manica, I. (ed). Ed. Cinco Continentes, LTDA., Porto Alegre, Brazil. 374 p.*
- Martínez M., J., López M., Betancourt B. J., Barceló P. H., Montes M. E., Regó R. 2001. Estudio toxicológico preclínico de la *Psidium guajava* L. (Guayaba). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2: 56-61.
- Marschner, H. 2002. Mineral Nutrition of Higer Plants. Institute of Plant Nutrition University of Hohenheim Germany. Second Edition. 862 p.
- Matsuo T., Hanamure N., Shimo K., Nakamura Y., and Tomita I. 1994. Identification of (+)-gallocatechin as a bio-antimutagenic compound in *Psidium guava* leaves. *Phytochemistry* 36(4): 1027-1029.
- Mengel, K. 2007. Potassium. *In: Handbook of plant nutrition. Eds. Barker, A. V. and D. J. Pilbeam. RCR Press Taylor & Francis Group, LLC. USA. pp: 91-120.*
- Méndez, P. F. 1995. Cultura de goiabera. *Associacao brasileirados proa. De goiaba. Brasil.*
- Milan, A. R. 2008. Collection and evaluation of guava (*Psidium guajava* L.), for nematode resistance in Malaysia. *In: Abstracts of the 2nd International Symposium on Guava and Other Myrtaceae. Eds: W. Rhode and G. Fermin. México. pp: 86.*

- Mitra S. K., P. K. Pathak and A. Sarkar. 2008. Overview of guava production in the world. *In: Abstracts of the 2nd International Symposium on Guava and Other Myrtaceae*. Eds: W. Rhode and G. Fermin. México. pp: 75-76.
- Mitra S. K. 1988. Guava. *In: Mineral nutrition of fruit crops*. Eds. Bose T. K., S. K. Mitra and M.K. Sadhu. Press Service Company. Calcuta, India. pp: 353-363.
- Mondragón-Jacobo C., L. M. Toriz-Ahumada and H. Guzman-Maldonado. 2008. Generation of pink-fleshed guavas to diversity commercial production in central Mexico. *In: Abstracts of the 2nd International Symposium on Guava and Other Myrtaceae*. Eds: W. Rhode and G. Fermin. México. pp: 77.
- Moncur, M. W. 1988. Floral development of tropical and subtropical fruit and nut species. An atlas of scanning electron micrographs. Australia. Editorial CSIRO. pp: 98-100.
- Monge E., L. Montañés y J. Val. 1997. Proteins, photosynthetic pigments and polar lipids changes of thylakoid biomembrane from prunus affected by iron chlorosis. *Mineral Nutrition and Fertilizer Use for Deciduous Fruit Crops*. ISHS Acta Horticulturae 448: 51-58.
- Moseley J., J. Quinn, M. Eriksson and S. Merchant. 2000. The Crd1 gene encodes a putative di-iron enzyme required for photosystem I accumulation in copper deficiency and hypoxia in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The EMBO Journal* 19(10): 2139-2151.
- Morton, J. F. 1987. Myrtaceae. Guava (Plate L). *In: Fruits of warm climates*. University of Miami. U.S.A. Media Incorporated. pp: 356-362.
- Nakasone, H. Y. and R. E. Paull. 1998. Tropical fruits. Cab International. pp: 149-172.
- Negi S. S. and S. Rajan. 2007. Improvement of guava through breeding. *Proceedings of the International Guava Symposium*. Eds. Singh G., Kishun R. and R. Chandra. ISHS Acta Horticulturae 735: 31-37.

- Norma Mexicana: NMX-FF-040-SCFI-2002. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano-fruta fresca-guayaba (*Psidium guajava* L.).
- Nuez, F. y J. M. Carrillo. 2000. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. España. pp: 23-118.
- Núñez-Colín C. A., Nieto-Ángel, R., Barrientos-Priego, A. F., Segura, S., Sahagún-Castellanos, J., and González-Andrés F. 2008a. Distribución y caracterización eco-climática del género *Crataegus* (Rosaceae subfam. Maloideae) en México. Rev. Chapingo serie Horticultura 14(2): 177-184.
- Núñez-Colín C. A., R. Nieto-Ángel, A. Barrientos-Priego; J. Sahagún-Castellanos; S. Segura, F. González-Andrés. 2008b. Variability of three regional sources of germplasm of tejocote (*Crataegus* spp.) from central and southern Mexico. Genetic Resources and Crop Evolution 55: 1159-1165.
- Padilla R., J. S., E. González G., F. Esquivel V., E. Mercado S., S. Hernández D., N. Mayek P. 2002. Caracterización de germoplasma sobresaliente de guayabo de la región Calvillo-Cañones, México. Fitotecnia Mexicana 25(004): 393-399.
- Padilla R., J. S., E. González G., L. Reyes M., M. Á. Perales de la C., E. M. Mercado S. y N. Mayek P. 2003. Caracterización de germoplasma de guayabo de la Región Calvillo-Cañones. In: Padilla, R.J.S., L. Reyes M., E. González G. y M. A. Perales de la C. (Eds.). Memoria. Primer Simposio Internacional de la Guayaba. Aguascalientes, México. pp: 54-70.
- Padilla-Ramírez J. S., E. González-Gaona and E. S. Osuna-Ceja. 2008. Collection and characterization of Mexican guava (*Psidium guajava* L.) germplasm. In: Abstracts of the 2nd International Symposium on Guava and Other Myrtaceae. Eds: W. Rhode and G. Fermin. México. pp: 79.
- Palacios, R., G. J. y A. Palacios R. G. 2002. Por las carreteras de México. GUIA ROJI S. A. de C. V. México D. F. 144 p.
- Patiño, V. M. 1963. Plantas cultivadas y animales domésticos en América

- equinoccial. Tomo 1. Frutales. Imprenta Departamental. Cali, Colombia. pp: 372-379.
- Perales de la C., M. y F. Silguero J. 1995. Caracterización de colectas de guayaba, *Psidium guajava* L., de la región Calvillo-Cañones por forma y componentes del fruto. *Agricultura Técnica en México* 21(2): 195-203.
- Pennington, T. D., J. Sarukhán K. 2005. Árboles tropicales de México: Manual para la identificación de las principales especies. Texto Científico Universitario. Fondo de Cultura Económica. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 523 p.
- Pickersgill B. 1969. The archaeological record of chili peppers (*Capsicum Spp.*) and the sequence of plant domestication in Peru. *Society for American Archaeology. American Antiquity* 34(1): 54-61.
- Rajan S., Yadava, L.P., Kumar, R.A.M., and Saxena, S. K. 2007. GIS based diversity analysis of guava growing distribution in Uttar Pradesh. *Proceedings of the I International Guava Symposium*. Eds: Singh G., Kishun R. and R. Chandra. *ISHS Acta Horticulturae* 735: 109-113.
- Rahayu Y., S. and V. Römheld. 2001. Does zinc nutrition affect calcium disorder of fruits?. *Proceedings of the IV International Symposium on Mineral Nutrition in Fruit*. Eds: D. & G. Neilsen, Fallahi & Peryea. *ISHS. Acta Horticulturae* 564: 135-143.
- Rebouças S. J., A., T. N. Hojo R., N. Oliveira D., R. Hissayuki H. and M. Pereira B. 2003. Guava crop in Brazil. *In: Memoria del Primer Simposio Internacional de la guayaba*. Eds: J. S. Padilla R., L. Reyes M., E. González G. y M. A. Perales de la C. Aguascalientes, México. pp: 84-115.
- Rhode W. 2008. The GUAVAMAP project. *In: Abstracts of the 2nd International Symposium on Guava and Other Myrtaceae*. Eds: W. Rhode and G. Fermin. México. pp: 81.

- Rodríguez R., L. E., Y. Gutiérrez G., R. Quintero. 1997. Estudio farmacognóstico y valoración del extracto fluido obtenido de las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2(2-3): 26-29.
- Rodríguez, C., B. y Ma. C. Porras M. 2002. Botánica sistemática. Compilación. Universidad Autónoma Chapingo. pp: 224-226.
- Rodríguez N., J. Valdés-Infante, D. Becker, B. Velázquez, G. González, D. Sourd, J. Rodríguez, N. Billote, A. M. Risterucci, E. Ritter and W. Rohde. 2007. Characterization of guava accessions by SSR markers, extensión of the molecular linkage map, and mapping of QTLs for vegetative and reproductive characters. *Proceedings of the I International Guava Symposium*. Eds: Singh G., Kishun R. and R. Chandra. *ISHS Acta Horticulturae* 735: 201-215.
- Römheld, V. y M. Nikolic. 2007. Iron. *In: Handbook of plant nutrition*. Eds. Barker, A. V. and D. J. Pilbeam. RCR Press Taylor & Francis Group, LLC. USA. pp: 329-350.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. México D. F. Edit. Limusa. 397 p.
- SAGARPA. 2007. Sistema-Producto Guayaba. Página Consultada el día 6 de Octubre del 2008.
<http://www.guayaba.gob.mx/index.php?portal=guayaba>.
- Samaniego-Russo J. A., E. Sánchez-Sánchez, F. Cabrera-Carbajal and M. Madrid-Cruz. 2008. Fruit production of 25 guava (*Psidium guajava* L.) selections in southern Sonora, Mexico. *In: Abstracts of the 2nd International Symposium on Guava and Other Myrtaceae*. Eds: W. Rhode and G. Fermin. México. pp: 78.
- Sánchez-Cordero V. and Martínez-Meyer, E. 2000. Museum specimen data predict crop damage by tropical rodents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 7074-7077.
- Sánchez-Teyer L. F., A. Barraza-Morales, L. Keb, F. Barredo, A. Quiroz-Moreno, A. O'Connor-Sánchez and J. S. Padilla-Ramírez. 2008. Assessment of genetic

- diversity of mexican guava germplasm using molecular markers. *In: Abstracts of the 2nd International Symposium on Guava and Other Myrtaceae*. Eds: W. Rhode and G. Fermin. México. pp: 15.
- Sharma A. S., S. K. Sehrawat, R. S. Singhrot and K. S. Boora. 2007. Assessment of genetic diversity and relationship among *Psidium* spp. through RAPD analysis. *Proceedings of the I International Guava Symposium*. Eds: Singh G., Kishun R. and R. Chandra. ISHS Acta Horticulturae 735: 71-78.
- SAS. 2000. Statistics Analysis System for windows version 9.0. SAS Institute, Inc. Cary, N.C. USA.
- Saxena S. K., S. Rajan, R. Chandra, N. Srivastava and A. Bajpai. 2007. Molecular characterization of closely related open pollinated seedling selections in guava. *Proceedings of the I International Guava Symposium*. Eds: Singh G., Kishun R. and R. Chandra. ISHS Acta Horticulturae 735: 49-55.
- Segura S., Coopkens D'eeckenbrugge, G., Lopez, L., Grum, M., and Guarino, L. 2003. Mapping the distribution of five species of *Passiflora* in Andean countries. *Gen. Resour. Crop Evol.* 50(6): 555-566.
- Scheaffer, R., W. Mendenhall, L. Ott. 1987. Elementos de muestreo. Grupo Editorial Iberoamérica. Traducido por: G. R. Sánchez, J. R. Gómez A. 321 p.
- Shen J., F. Zhang, Q. Chen, Z. Rengel, C. Tang and C. Song. 2002. Genotypic difference in seed iron content and early responses to iron deficiency in wheat. *Journal of Plant Nutrition* 25(8): 1631-1643.
- Singh H. P. and G. Singh. 2007. Nutrient and water management in guava. *Proceedings of the I International Guava Symposium*. Eds: Singh G., Kishun R. and R. Chandra. ISHS Acta Horticulturae 735: 389-397.
- Stansfield, W. 1992. Genética. Tercera edición. Ed. McGraw-Hill. México D.F. 574 p.
- Storey, J. B. 2007. Zinc. *In: Handbook of plant nutrition*. Eds. Barker, A. V. and D. J. Pilbeam. RCR Press Taylor & Francis Group, LLC. USA. pp: 411-436.
- Sydney, M. 1986. Plant analysis and interpretation manual. Eds. D. J. Reuter and

- J. B. Robinson. Edit. Inkata Press. pp: 132.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 2002. Plant physiology. Sinauer Associates, Inc. pp: 67-86.
- Takano J., K. Noguchi, M. Yasumori, M. Kobayashi, Z. Gajdos, K. Miwa, H. Hayashi, T. Yoneyama and T. Fujiwara. 2002. Arabidopsis boron transporter for xylem loading. *Nature* 420: 337-339.
- Tapia, P., D. 2006. Variabilidad genética de cultivares de guayabo (*Psidium guajava* L.). Tesis de Maestría. Postgrado en Biotecnología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. 81 p.
- Tohme J., Jones, P., Beebe, S., and Iwanaga, M. 1995. The combined use of agroecological and characterization data to establish the CIAT *Phaseolus vulgaris* core collection. In: Hodgkin, T., Brown, A. H. D., Van Hintum, Th. J. L., and Morales, E. A. V. (eds) Core Collection of Plant Genetic Resources. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Rome. pp: 95-115.
- Ugent D., S. Pozorski, and T. Pozorski. 1986. Archaeological manioc (*manihot*) from coastal Peru. Springer on behalf of New York Botanical Garden Press. *Economic Botany* 40(1): 78-102.
- UPOV. 1987. International Union for the Protection of New Varieties of Plants. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, homogeneity and stability of Guava (*Psidium guajava* L.). Ginebra. 27 p.
- USDA. 2009. Noncitrus Fruits and Nuts. Preliminary Summary. pp: 62. Consultado el 25 de enero del 2009 en la siguiente dirección:
<http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/NoncFruiNu/NoncFruiNu-01-23-2009.pdf>
- Valdés-Infante J., N. N. Rodríguez-Medina, B. Velásquez, D. Rivero, F. Martínez, A-M. Risterucci, N. Billotte, D. Becker, E. Ritter and W. Rohde. 2008. Simple sequence repeats (SSRs) for diversity characterization of guava (*Psidium guajava* L.). In: Abstracts of the 2nd International Symposium on Guava and Other Myrtaceae. Eds: W. Rhode and G. Fermin. México. pp: 55-56.

- Valadez, M., E., y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. Edit. Mundi-Prensa, México D. F. 147 p.
- Valecillos C., Y. Aranguren and G. Fermin. Natural resources conservation: Guava and other Myrtaceae germplasm ex situ conservation at Mérida, Venezuela. *In: Abstracts of the 2nd International Symposium on Guava and Other Myrtaceae*. Eds: W. Rhode and G. Fermin. México. pp: 62.
- Vara, M., A. 1994. La dinámica de la milpa en Yucatán: el solar. *In La milpa en Yucatán, un sistema de producción agrícola tradicional*. Tomo I. Colegio de Postgraduados México. pp: 225-246.
- Vargas A., D., Soto H., M., González H., V. A., Engleman, E. M., Martínez G., A. 2006. Cinética de acumulación y distribución de flavonoides en guayaba (*Psidium guajava* L.). *Agrociencia* 40(001): 109-115.
- Waugh R. and W. Powell. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Tibtech* 10: 186-191.
- Wilcox, D., Dove B., Mc. David D., Greer D. 2002. Image Tool for windows. 3.0. University of Texas Health Science Center in San Antonio, USA.
- Williams J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18 (22): 6531-6535.
- Wright, S. 1978. Evolution and the genetics of populations. Vol. 4. Variability within and among natural populations. University of Chicago press. Chicago, Ill. USA. 580 p.
- Yeh, F. C., Yang R. and Boyle T. 1999. POPGENE V. 1.31. For Population Genetic Analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research. Canada.
- Zagaja, S. W. 1988. Exploración de recursos genéticos. *In: Moore J.N. and Janick J. (eds.), Métodos genotécnicos en frutales*. AGT Editor. México D. F. p. 3-12.

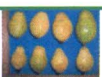
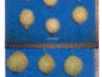
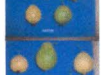
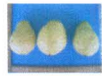
X. ANEXOS

Anexo 1. Valores de las características evaluadas en hoja de las plantas por
accesión.

GRUPO	ACC	AREA	PER	LEJEMA	LEJEM	ELON	RDON	DFERT	COMP	ANG
I	E01	34.91	29.37	11.13	4.40	2.55	0.52	6.66	0.62	29.72
I	E02	40.47	30.42	11.70	4.74	2.47	0.54	7.09	0.61	49.42
I	E05	39.13	27.34	9.71	5.28	1.85	0.66	7.05	0.73	60.51
I	E07	30.37	26.35	9.89	4.37	2.27	0.55	6.21	0.63	43.63
I	E12	32.33	28.51	9.41	4.62	2.09	0.55	6.38	0.69	52.94
I	E19	42.83	30.33	11.38	4.85	2.35	0.58	7.32	0.64	47.81
I	E20	25.77	25.57	8.70	3.98	2.19	0.51	5.66	0.65	52.83
I	E22	34.93	26.27	9.36	4.83	1.95	0.64	6.67	0.71	41.91
I	Z02	39.46	29.32	11.79	4.61	2.62	0.58	7.10	0.61	45.78
I	Z11	33.57	25.55	9.50	5.11	1.87	0.64	6.48	0.68	32.57
I	Z12a	41.73	29.37	11.57	5.34	2.18	0.61	7.32	0.63	34.17
I	Z12b	38.18	30.74	12.40	4.55	2.66	0.51	6.78	0.56	35.83
I	Z01	65.20	33.34	12.62	6.76	1.88	0.74	9.06	0.73	60.42
I	Z04	45.25	29.32	10.90	5.60	1.95	0.67	7.57	0.69	59.32
I	Z05	29.04	25.85	10.64	3.84	2.78	0.55	6.07	0.57	36.25
I	Z13	39.67	27.73	10.86	5.15	2.14	0.66	7.18	0.65	37.55
I	Z14	47.25	29.09	10.83	5.80	1.88	0.70	7.75	0.72	42.84
I	Z17	44.60	28.22	10.84	5.47	2.02	0.68	7.45	0.68	39.33
II	E03	38.53	26.42	9.44	5.33	1.79	0.68	6.96	0.74	39.59
II	Z08a	46.17	31.29	12.67	5.34	2.46	0.58	7.66	0.60	47.11
II	Z08b	21.36	20.24	8.08	3.67	2.19	0.65	5.20	0.65	42.03
II	Z09	27.72	24.83	10.12	3.78	2.74	0.56	5.92	0.59	37.59
II	Z10	35.47	26.59	10.61	4.70	2.25	0.63	6.68	0.63	43.99
II	Z16	41.42	29.91	12.03	4.95	2.51	0.57	7.21	0.61	37.99
II	Z18	27.12	23.20	9.57	3.96	2.49	0.60	5.74	0.60	51.89
II	Z03	48.95	32.31	12.66	5.65	2.36	0.50	7.89	0.63	31.75
II	Z06	54.48	36.12	14.51	5.61	2.65	0.53	8.31	0.58	44.32
II	Z07	35.05	25.82	10.45	4.70	2.27	0.66	6.63	0.65	36.91
II	Z15	43.61	29.13	11.56	5.45	2.11	0.65	7.44	0.64	38.9
III	E11	25.57	21.78	8.07	4.22	1.92	0.68	5.68	0.71	40.4
III	E16	35.86	29.63	11.47	4.25	2.71	0.51	6.73	0.59	27.22
III	E21	26.52	23.48	8.48	4.02	2.10	0.60	5.72	0.68	51.73
III	E18	31.18	25.67	9.90	4.27	2.34	0.59	6.26	0.63	54.09
III	E04	33.73	24.99	8.84	5.12	1.74	0.68	6.53	0.74	36.14
III	E06	50.34	29.86	11.37	5.92	1.92	0.70	8.00	0.70	44.72
III	E08	54.50	32.95	11.71	6.04	2.00	0.64	8.36	0.70	45.84
III	E09	51.17	38.39	13.10	5.46	2.44	0.47	8.08	0.62	29.04
III	E10	38.51	28.23	10.28	5.01	2.08	0.61	6.98	0.68	52.08
III	E13	59.36	33.35	12.46	6.14	2.08	0.66	8.68	0.69	48.97
III	E14	44.95	31.05	11.68	5.04	2.32	0.59	7.56	0.65	41.64
III	E15	34.14	31.76	11.64	4.23	2.77	0.43	6.59	0.57	40.83
III	E17	43.85	30.57	10.97	5.26	2.09	0.58	7.43	0.68	52.26

Anexo 2. Valores de las características evaluadas en fruto y semillas de las plantas por accesión.

GRUPO	ACCESIÓN		PFC	GP	PPSS	PSC M	PSS M	PM	PCS	PTS S	SS M	DP	DE	IND
I	E01		34.50	6.90	26.00	8.10	2.90	5.20	0.79	1.41	11.40	3.65	4.06	0.90
I	E07		52.67	6.22	35.33	17.11	3.56	13.56	0.66	1.96	10.39	4.41	4.57	0.97
I	E12		60.67	6.33	38.50	21.92	4.92	17.00	0.92	2.74	9.67	4.46	4.84	0.92
I	E19		35.18	7.00	25.00	9.73	2.27	7.45	0.61	1.15	11.00	4.10	4.44	0.92
I	E22		45.78	6.89	32.22	19.22	3.44	15.78	0.98	1.80	8.78	4.17	4.27	0.98
I	E16		72.30	9.00	57.20	14.80	3.80	11.00	1.33	2.03	8.15	5.09	5.10	1.00
I	E06		130.78	10.66	94.22	36.00	6.67	29.33	0.94	3.46	10.39	6.49	5.98	1.09
I	E21		90.00	8.50	67.50	22.25	5.00	17.25	1.70	2.28	13.88	5.38	5.38	1.00
I	E14		125.71	11.57	99.29	26.00	5.00	21.00	1.33	3.03	8.93	6.54	6.04	1.08
I	E02		31.43	5.00	21.29	10.14	4.00	6.14	0.59	2.03	9.21	4.06	3.64	1.11
I	E05		86.33	7.00	55.67	29.67	7.00	22.67	0.83	3.65	8.00	5.83	5.20	1.12
I	E20		26.83	5.17	16.00	9.17	2.17	7.00	0.55	1.14	14.50	4.08	4.00	1.02
I	Z05		77.50	5.58	45.70	31.40	9.40	22.00	1.16	5.42	11.50	6.10	4.98	1.22
I	Z11		42.40	11.8	24.20	15.00	5.60	9.40	1.01	2.97	13.00	5.13	4.81	1.07
I	Z12 a		68.40	13.2	44.20	21.60	5.50	16.10	0.85	2.88	13.50	6.02	5.75	1.05
I	Z12 b		67.20	13.0	43.30	21.20	5.20	15.90	0.84	2.80	13.00	6.00	5.00	1.20
II	E03		34.40	6.60	25.70	8.20	2.60	5.60	1.11	1.51	13.20	4.62	3.82	1.21
II	Z08 a		29.60	13.2	20.90	6.50	2.30	4.20	0.95	1.09	15.10	5.10	4.21	1.21
II	Z16		27.10	5.73	19.10	7.40	2.40	5.00	1.00	1.26	15.70	3.91	3.38	1.16
II	Z08 b		40.10	6.15	29.60	10.60	3.10	7.50	1.09	1.80	15.70	3.91	3.38	1.16
II	Z09		35.80	14.1	26.70	7.50	2.20	5.30	1.20	1.05	16.70	5.44	4.37	1.24
II	Z10		29.20	12.3	22.60	7.30	1.60	5.70	1.44	0.87	15.60	5.42	4.15	1.31

II	Z18		70.00	10.2 6	58.00	10.44	2.22	8.22	1.3 9	1.22	10.9 4	6.6 7	4.5 7	1.46
II	Z03		64.20	10.6	41.10	19.70	5.50	14.2 0	0.9 3	3.31	14.1 4	6.7 6	5.2 4	1.29
II	Z15		71.50	12.3	47.70	19.50	5.00	14.5 0	1.0 1	2.61	12.7 0	6.7 7	5.7 1	1.19
II	Z06		78.80	13.0	50.70	27.00	8.50	18.5 0	1.3 2	4.21	11.9 2	7.0 6	5.5 2	1.28
II	Z07		118.0 0	12.4	73.60	42.70	9.20	33.5 0	1.4 1	4.72	10.0 5	8.3 4	6.3 0	1.32
II	Z01		105.8 0	14.1	79.40	22.30	5.10	17.2 0	1.1 6	2.57	10.2 6	7.7 0	6.1 1	1.26
II	Z02		47.20	12.5	30.10	17.40	4.10	13.3 0	0.7 5	2.20	11.1 5	5.4 9	4.9 6	1.11
II	Z04		66.78	12.1	45.67	18.78	7.22	11.5 6	0.8 3	3.06	12.8 9	5.9 7	5.4 6	1.09
II	Z13		108.6 0	15.9	76.50	27.90	5.90	22.0 0	1.3 0	2.41	11.1 5	7.0 3	6.3 3	1.11
II	Z17		116.3 3	9.87	85.83	29.33	5.33	24.0 0	1.3 2	2.85	10.1 7	6.7 1	5.8 7	1.14
II	Z14		105.4 0	18.0	73.40	29.20	8.50	20.7 0	1.1 5	2.96	13.1 8	6.7 2	6.2 9	1.07
III	E04		391.3 3	17.5 8	254.0 0	91.17	11.33	79.8 3	1.1 9	5.27	7.75	9.4 0	8.5 5	1.10
III	E08		244.2 9	17.6 4	203.7 1	42.14	7.57	34.5 7	2.1 0	3.33	8.36	7.2 7	7.3 6	0.99
III	E10		195.6 7	16.5 8	168.5 0	27.00	6.75	22.5 0	1.4 4	1.57	9.50	8.3 6	7.1 0	1.18
III	E11		181.3 3	14.3 2	149.6 9	32.75	7.07	26.6 9	1.4 8	2.22	8.37	8.2 6	6.7 1	1.23
III	E13		192.7 1	13.7 1	155.8 6	36.14	7.14	29.0 0	2.0 1	3.84	5.93	9.1 1	6.7 1	1.36
III	E09		167.0 0	12.0 6	130.8 8	38.25	7.38	30.8 8	1.5 3	2.87	7.25	8.1 6	6.3 4	1.29
III	E15		246.0 9	17.9 1	216.0 9	29.27	4.55	24.7 3	1.3 9	2.15	5.45	9.2 5	7.0 9	1.30
III	E17		318.5 8	18.4 2	276.4 2	39.83	7.42	32.4 2	2.2 7	4.01	6.38	9.8 6	7.7 2	1.28
III	E18		128.8 8	11.2 5	104.3 8	24.00	5.88	18.1 3	1.3 9	2.87	8.31	7.3 9	5.7 4	1.29

Anexo 3. Estructura Canónica Total de las características morfológicas, de las 42 accesiones, en las dos Funciones Discriminantes.

Variable	FDC1	FDC2
Color del tallo	-0.355833	-0.179362
Posición de las ramas	-0.417891	0.090927
Color del brote	0.527661	-0.106128
Coloración por antocianinas	0.633369	0.100943
Intensidad	0.431827	-0.035673
Pubescencia	0.174344	0.066173
Grosor del brote	0.221233	0.089561
Forma de la hoja	-0.007855	0.194131
Curvatura en la sección de la cruz	-0.444990	-0.035869
Torcimiento	0.041565	0.061601
Grado de curvatura	-0.137930	0.241590
Grado de ondulación	-0.208247	0.033278
Forma de la base de la hoja	-0.469008	-0.033018
Forma de la punta de la hoja	-0.306751	-0.002570
Forma del polo peduncular del fruto	0.668625	-0.156576
Forma del cuello en relación al resto del fruto	0.422590	-0.212244
Diámetro de la cavidad del cáliz	0.396728	0.049500
Collar rígido alrededor de la cavidad del cáliz	-0.069861	0.671671
Espesor de la pulpa externa en relación al diámetro del corazón	0.021026	-0.547804
Área	0.187446	-0.185783
Redondez	0.308189	-0.044471
Ángulo de inserción del tercer par de hojas	0.013383	-0.080073
Grosor de pulpa	0.179241	-0.692541
Peso de la pulpa sin semillas	-0.268770	-0.875153
Peso semilla sin mucílago	-0.148472	-0.441053
Peso del mucílago	-0.236226	-0.590717
Peso de 100 semillas secas	0.008547	-0.721617
Sólidos solubles del mucílago	0.516604	0.549149
Índice de forma del fruto	0.461774	-0.498265

FDC = Función Discriminante Canónica

Anexo 4. Calibres establecidos en la norma Codex Stan 215-1999 para la guayaba.

Código de Calibre	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Peso en g	> 450	351 - 450	251 - 350	201 - 250	151 - 200	101 - 150	61 - 100	35 - 60	< 35
Diámetro en mm	> 100	96 - 100	86 - 95	76 - 85	66 - 75	54 - 65	43 - 53	30 - 42	< 30

ANEXO C. Estructura Canónica Total de las características morfológicas, de las 72 plantas, en las dos Funciones Discriminantes

Variable	FDC1	FDC2
Color del tallo	-0.078665	-0.196968
Posición de las ramas	-0.005431	0.314189
Coloración por antocianinas	-0.476276	-0.334186
Pubescencia	0.403313	0.088451
Grosor del brote	0.077336	0.321805
Forma de la hoja	0.070403	0.117181
Curvatura en la sección de la cruz	0.253674	0.311628
Torcimiento	0.336467	-0.009482
Curvatura del nervio central	-0.604791	0.449504
Grado de curvatura	-0.345668	0.265286
Ondulación del margen	0.423037	-0.029374
Forma de la base de la hoja	0.527537	0.186878
Forma de la punta de la hoja	-0.316006	0.268216
Longitud de hojas del último entrenudo	-0.166107	0.399167
Diámetro de rama al tercer par de hojas	-0.024218	0.391143
Incremento en altura	0.115585	0.106258
Incremento en diámetro del tallo	0.105150	0.133807
Incremento en diámetro de la primera rama	-0.067783	-0.138894
Área foliar	0.231124	0.090200
Peso seco de tallo	0.537708	0.154803
Peso seco de ápices radicales	0.254892	-0.065710
Peso seco de raíz	0.018205	-0.145632
Ángulo del extremo terminal del ápice radical	0.552506	0.104423
Diámetro del ápice radical	0.422244	0.054006
Índice de biomasa seca	0.529965	0.289011
Área	-0.262753	0.360450
Redondez	0.120837	0.096394
Compactación	0.095722	0.246803
Ángulo de inserción del tercer par de hojas	0.401844	0.458720

FDC = Función Discriminante Canónica

Anexo 6. Estructura Canónica Total de las Características Morfológicas Cuantitativas evaluadas en el experimento de nutrición, en las tres Funciones Discriminantes.

Variable	FC1	FC2	FC3
Longitud de hojas del último entrenudo	0.170835	0.117144	0.130810
Diámetro de Rama al tercer par de hojas del antepenúltimo entrenudo	0.062377	0.255433	-0.058492
Altura Total de la Planta	0.123298	0.013003	-0.093817
Incremento en Altura	0.265797	0.410071	0.261693
Incremento en Altura a Primera Rama	0.116932	0.357754	0.322228
Incremento en Diámetro de Tallo	0.402922	-0.060171	0.199103
Incremento en Diámetro de Rama	-0.123526	0.052314	-0.126601
Área Foliar	-0.066650	-0.329798	0.513231
Peso seco de hojas	0.122203	-0.274478	0.231352
Peso fresco de hojas	0.180504	-0.249786	0.303357
Peso fresco de tallo	0.027741	-0.164853	0.231545
Peso seco de tallo	-0.025626	-0.191480	0.183549
Número de ápices radicales	-0.187651	0.249070	0.007238
Peso seco de ápices radicales	-0.253868	0.299397	0.129264
Peso fresco de raíz	0.043572	-0.358531	-0.091269
Peso seco de raíz	0.005990	-0.327480	-0.000728
Altura total de la planta	0.123298	0.013003	-0.093817
Ángulo de los ápices radicales	0.251604	-0.133370	-0.031573
Ancho de los ápices radicales	-0.132102	-0.347279	-0.082136
Índice de Biomasa Fresca	0.208408	0.014184	0.251797
Índice de Biomasa Seca	0.103294	0.128523	0.100601

FC = Función Discriminante Canónica

Anexo 7. Relación de bandas con las deficiencias de micronutrimetos por tipo con base en el análisis de correspondencia.

ME	INI	Media	IP	% A	Sassaoka	IP	% A	San	IP	% A	Oaxaca	IP	% A
		China	E1	E2		E1	E2	Cristóbal	E1	E2		E1	E2
Cu	B1	14,17	0.252	0.149	49.83	19,17	0.118	0.105	0.243	0.143	44.56	0.168	0.163
Fe		10,11				14		12					
Zn		3,4,5				14		4,11					
Mn		1,15				17,19		1,3					
B		2				10,13		6,9					
	B2	PA				NA		PA					
B	B3	3,4	0.416	0.416	100.00	PA		1,2	0.166	0.166	100.00	NA	
Fe		1,2						4					
Mn		1,2											
Cu								1,2,4					
Zn								1,2					
B	B4		0.434	0.254	88.49	1,2,7,9,11	0.674	0.300	1.0	1.0	77.82	AP	
Zn								10					
Cu						1,2,3,5		9					
Fe						3,5		9					
Mn		2,3,6,10				1,2,10							
Cu	B5	4	0.643	0.310	70.23	AP		3,7,9	0.830	0.583	74.59	0.801	0.619
Fe		9						3,7,9					
Zn								9					
Mn		8						4					
B		5						1,9					
Cu	B6	5	1.0	1.0	100.00	NA		10,13	0.933	0.718	64.65	0.448	0.333
Fe								7,10,13,16					
Zn													
Mn													
B		1,10,15						1					

ME	INI	Media China	IP E1	IP E2	% A	Sassaoka	IP E1	IP E2	% A	San Cristóbal	IP E1	IP E2	% A	Oaxaca	IP E1	IP E2
Cu	B7	PA				10	1.0	1.0	72.73	8	0.693	0.525	79.28	1	1.0	1.0
Fe						7				8						
Mn						3				3				3		
Zn										7				1,6,11		
B						3				7						
Cu	B8	PA				NA					0.557	0.080	100.00		1.0	0.52
Fe										10,12						
Mn																
B														2		
Cu	B9	PA				NA				2	1.0	1.0	100.00	NA		
Fe										2						
B										3,4				3,6,7		
Cu	B10		0.764	0.487	90.17	15	1.0	1.0	93.16	1,3,7	0.881	0.768	62.25	11	0.859	0.73
Fe		1				3,15				1,3,7,11				15		
Zn		13								13				13		
Mn		15				8				4,6,8				2,3,5,7		
B		5,12				15				10,13				2,3,5		
Cu	B11		0.882	0.615	72.79		1.0	0.551	85.79	1,9	0.615	0.447	90.03		1.0	1.0
Fe		3								1,9						
Mn		8				1,5								15,16,17		
B		12				2				15						
Cu	B12		0.375	0.267	68.94		1.0	0.576	90.09	2	1.00	0.371	84.31	7	1.0	0.66
Fe		5,9								3,9						
Zn										9						
Mn		4,6,8				3										
B						2,4,9,10								1,3		
Cu	B13	6	0.90	0.74	85.54	AP				7,11,16	0.083	0.083	100.00	NA		
Fe		4,16								11						
Mn		4,16														
B		3,10,11,15														

ME	INI	Media	IP	IP	% A	Sassaoka	IP	IP	% A	San	IP	IP	% A	Oaxaca	IP	% A
		China	E1	E2			E1	E2		Cristóbal	E1	E2			E1	
Cu	B20	6,12	0.609	0.378	57.66	2,4,5,7,9,10	0.391	0.220	81.81	11	0.351	0.198	97.06	AP		
Fe		3,4,12								7,10						
Zn		4,9,12				12										
Mn		3,8,10														
B		9				5										

ME = Micronutrimiento. INI = Iniciador. NA = No amplificó. PA = Pocas ampliificaciones. IP = Inercia Principal. E1 = Eje uno. E2 = Eje dos.
 %A = Porcentaje de explicación acumulado al segundo eje.