



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Centro de Desarrollo de Productos Bióticos

Departamento de Biotecnología

**“La catequina como indicador para la
propagación vegetativa de zapote amarillo
(*Pouteria campechiana*)”**

T E S I S

Que para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos

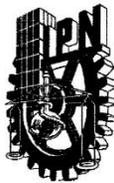
PRESENTA

Alumno: José Fernando Pérez Barcena

Directora: Dra. Silvia Evangelista Lozano



Yautepec de Zaragoza, octubre, 2016



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Yautepec siendo las 12:00 horas del día 03 del mes de Noviembre del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CeProBi para examinar la tesis titulada:

"La catequina como indicador para la propagación vegetativa de zapote amarillo (*Pouteria campechiana*)"

Presentada por el alumno:

PÉREZ
Apellido paterno

BARCENA
Apellido materno

JOSÉ FERNANDO
Nombres

Con registro:

B	1	4	0	6	2	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directora de tesis

Dra. Silvia Evangelista Lozano

M. en C. María Isabel Cortés Vázquez

Dra. Edith Acama Acevedo

Dr. Francisco Rodríguez González

Dra. Martha Lucía Arenas Ocampo

Dra. Elsa Ventura Zapata

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Antonio Roberto Jiménez Aparicio



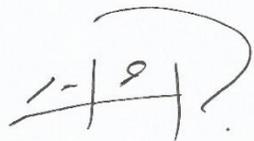
SEP-IPN
CENTRO DE DESARROLLO
DE PRODUCTOS BIÓTICOS
YAUTEPEC, MOR.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Con base en el artículo 57 fracción I del Reglamento de Estudios de Posgrado vigente y en la Sección IV del Código de Ética del IPN, hacemos constar que el trabajo de tesis "La catequina como indicador para la propagación vegetativa de zapote amarillo (*Pouteria campechiana*)" es responsabilidad del C. Dra. Silvia Evangelista Lozano y José Fernando Pérez Barcena, y que ni los datos experimentales ni el texto han sido usados para obtener otro grado académico en el país o en el extranjero. Cualquier colaboración o cita textual fue declarada y reconocida en el documento.

Yautepec, Morelos; a 05 de diciembre del 2016

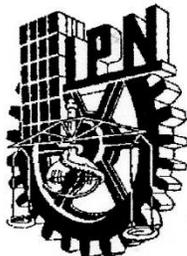
ATENTAMENTE



Alumno
José Fernando Pérez Barcena



Directora de tesis
Dra. Silvia Evangelista Lozano



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Yautepec, Morelos el día 05 del mes de diciembre del año 2016, el que suscribe **José Fernando Pérez Barcena** alumno del Programa de **Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos** con número de registro **B140620**, adscrito al **Centro de Desarrollo de Productos Bióticos**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Silvia Evangelista Lozano** y cede los derechos del trabajo titulado "**La catequina como indicador para la propagación vegetativa de zapote amarillo (*Pouteria campechiana*)**", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Carretera Yautepec-Jojutla, Km. 6, calle CEPROBI No. 8, Col. San Isidro, Yautepec, Morelos, México. C.P. 62731, Apartado Postal 24. Teléfonos: (735) 394 20 20, 3941896, (55) 57 29 69 00 Ext. 82500 / 82505. Fax 82512, 82521**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Nombre del alumno
José Fernando Pérez Barcena

Autorización de uso de obra

Instituto Politécnico Nacional
P r e s e n t e

Bajo protesta de decir verdad el que suscribe **José Fernando Pérez Barcena**, manifiesto ser autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada **“La catequina como indicador para la propagación vegetativa de zapote amarillo (*Pouteria campechiana*)”**, en adelante **“La Tesis”** y de la cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor, otorgo a el Instituto Politécnico Nacional, en adelante El IPN, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente en medios digitales **(Tesis empastadas y discos)** **“La Tesis”** por un periodo **indefinido** contado a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovará automáticamente en caso de no dar aviso expreso a **“El IPN”** de su terminación.

En virtud de lo anterior, **“El IPN”** deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de **“La Tesis”**.

Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de **“La Tesis”**, manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de **“La Tesis”**, por lo que deslindo de toda responsabilidad a El IPN en caso de que el contenido de **“La Tesis”** o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

México, D. F., 05 de diciembre del 2016.

Atentamente



José Fernando Pérez Barcena

Agradecimientos.

A mi familia por todo su amor.

A mis padres y hermanos por siempre ser una motivación.

A la Dra. Silvia Evangelista Lozano por todo el apoyo, la confianza y el cariño que me brindo durante todo este tiempo.

Al comité tutorial por sus valiosas aportaciones.

A la comisión revisora por sus contribuciones.

A Mary y a Uriel por su ayuda y trabajo constante.

A la M. en C. Vicky por su entusiasmo en el análisis con el equipo de HPLC

A la Lic. Estela por su trabajo constante en el laboratorio de microscopía.

A mis compañeros de equipo de trabajo, por sus observaciones durante cada reunión.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico proporcionado y fomentar la investigación del país.

ÍNDICE

	Página
Índice de figuras	I
Índice de cuadros	II
Resumen	III
Abstract	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 La actividad frutícola	3
2.2 Antecedentes del género <i>Pouteria sp.</i>	4
2.2.1 Clasificación y descripción de <i>Pouteria sp</i>	4
2.2.2 Descripción botánica	7
2.2.3 Distribución	8
2.2.4 Cultura histórica de <i>Pouteria campechiana</i>	10
2.2.5 Áreas de producción actual de <i>P. campechiana</i>	10
2.2.6 Condiciones climáticas para el cultivo de <i>P. campechiana</i>	11
2.2.7 Requerimientos de <i>P. campechiana</i>	12
2.2.8 Descripción del fruto de <i>P. campechiana</i>	13
2.3 La propagación vegetativa	16
2.4 Compuestos involucradas en el retardo o impedimento de la propagación vegetativa	18
2.5 Técnicas de detección de flavonoides	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPOTESIS	24
5. OBJETIVOS	24
6. METODOLOGÍA	25
6.1 Localización geográfica de los cultivos de <i>Pouteria campechiana</i>	25
6.2 Colecta de material biológico	25
6.3 Extracción y evaluación de la concentración de catequina mediante HPLC	25
6.3.1 Verificación de la concentración de compuestos fenólicos en los tejidos de propagación	25
6.3.2 Selección del método de extracción y evaluación de la concentración de catequina en diferentes épocas del año mediante HPLC	26
6.4 Evaluación de los depósitos de catequina mediante observación histológica	28
6.4.1 Selección del método de tinción con DMACA para la observación de catequina en cortes histológicos	28
6.4.2 Evaluación de los depósitos de catequina en diferentes épocas del año por análisis de imágenes	30

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
7.1 Verificación de la concentración de compuestos fenólicos en los organos de propagación	31
7.2 Selección del método de extracción de catequina	32
7.3 Evaluación de la concentración de catequina en diferentes épocas del año mediante HPLC	33
7.4 Selección del método de tinción con DMACA para la observación de catequina en cortes histológicos	37
7.5 Evaluación de los depósitos de catequina mediante análisis de imágenes	40
7.6 Estimación del periodo adecuado para la propagación de acuerdo a la menor concentración de catequina	41
8. CONCLUSIONES	42
9. BIBLIOGRAFÍA	43

Índice de figuras

Número de figura	Nombre de la figura	Página
1	Localidades en las que se reportan árboles cultivados de <i>Pouteria campechiana</i> en Centro América	21
2	Distribución <i>Pouteria campechiana</i> silvestre en Mesoamérica	21
3	Fruto de <i>Pouteria campechiana</i>	28
4	Concentración de catequina en diferentes meses de colecta de material de propagación de <i>Pouteria campechiana</i>	48
5	Historial meteorológico de Yautepec, Morelos del año 2015-2016	49
6	Micrografías de tejido de propagación de zapote amarillo A: Tinción con safranina/verde rápido, B: Tinción con DMACA, las micrografías corresponden a estaca semidura	50
7	Micrografías con la tinción con DMACA, A: Corte histológico de <i>Pouteria campechiana</i> (esta investigación), B: Corte de <i>Taxus baccata</i> , C: Corte de <i>Annona muricata</i>	47
8	Micrografías con la tinción con DMACA, A: Método indirecto, B: Método directo	52
9	Micrografías a diferentes tiempos de contacto ente el colorante DMACA y el tejido de <i>Pouteria campechiana</i>	52

Índice de cuadros

Número de cuadro	Nombre del cuadro	Página
1	Nombres comunes del fruto de <i>Pouteria campechiana</i>	18
2	Contenido de polifenoles totales mediante la técnica de Folin-ciocateult en tres diferentes tejidos de propagación (esqueje, estaca de madera semidura y estaca de madera dura)	45
3	Comparación de dos métodos de extracción para la obtención de catequina	46
4	Concentración de catequina en mg ES/ml cuantificada por HPLC, en diferentes épocas del año y diferente tejido de propagación de <i>Pouteria campechiana</i>	47
5	Comparación de dos métodos para la tinción con DMACA <i>P. campechiana</i> estaca de madera semidura	52
6	Mediciones de las células con depósitos de catequina en cortes histológicos de tejidos de propagación de <i>P. campechiana</i> con el software ImageJ	53

Resumen

Se cuantificó bioquímica e histológicamente la presencia de catequina en tejidos de propagación de *Pouteria campechiana*, durante diferentes épocas del año para la determinación del período de tiempo adecuado de propagación, basado en el tipo de material de propagación (esqueje, estaca de madera semidura y estaca de madera dura) y en el nivel más bajo de (+)-catequina (molécula que afecta el proceso de propagación vegetativa). La cuantificación de catequina en el material de propagación se llevó a cabo usando la técnica de HPLC y la tinción histológica con 4 dimetil-amino-cinamaldehido (DMACA). El tiempo de colecta del material de propagación es un factor importante para asegurar el éxito en la propagación y el mejor período de colecta con respecto a la menor concentración de catequina fue en enero y ocupando material de propagación de madera semisuave, seguido de mayo; y en agosto y septiembre, la época con las características menos deseables para realizar la propagación vegetativa de *Pouteria campechiana*

Abstract

The presence of catechin was measured biochemically and histologically in *Pouteria campechiana* propagating tissues at different times of the year to determine the appropriate propagation time, based on the type of propagation material (cutting, semi-hard wood and hardwood) and the lowest level of (+) - catechin (molecule affecting the vegetative propagation process). The quantification of catechin in the propagation material was carried out using the HPLC technique and histological staining with 4-dimethylamino cinnamaldehyde (DMACA). The collection time of the propagating material is an important factor to ensure success in propagation and the best collection period with respect to the lowest catechin concentration was in January and occupying semi-hard wood propagation material, followed by May; And in August and September, the period with the least desirable characteristics to carry out the vegetative propagation of *Pouteria campechiana*.

1. INTRODUCCIÓN

La actividad frutícola está íntimamente ligada a la agricultura; de los 18 millones de hectáreas del territorio nacional que se destina a la labor agrícola, 1.3 millones de estas hectáreas se utilizan para el cultivo de frutales (SAGARPA-SIACON, 2013). Esta actividad agrícola se asocia a la gran diversidad climática del país, que incluye: climas cálidos, secos, húmedos, templados y fríos que hacen de esta agroindustria una actividad primaria prometedora, que puede contribuir al desarrollo económico de México.

Por su naturaleza, la producción de frutales tiene un carácter sustentable que puede ser una fuente de empleo permanente y que permite arraigarse en las comunidades rurales, obtener buenos ingresos, desarrollar otras actividades o productos derivados de ellas, así como la elaboración de empaques, jugos, mermeladas, frutas secas, frutas cristalizadas y néctares, entre otras. Por otro lado, el cultivo de especies frutales constituye, desde sus inicios, una actividad de gran importancia económica y social dentro del sector agrícola. Según las estadísticas siempre han presentado una mayor redituabilidad promedio que el resto de especies cultivadas. Así mismo, el volumen de producción de los frutales prácticamente se ha duplicado de 1980 a 2011, pasando de casi 8.5 millones a 15.7 millones de toneladas (SAGARPA-SIACON, 2013)

México cuenta con 63 especies de frutas comercializadas y 220 especies con potencial económico (Borys, 2001). Por otra parte, obtener la materia prima potencialmente económica, es un reto para la investigación de los recursos frutícolas que se ha convertido en una prioridad científica; sobre todo, de aquellos frutales poco estudiados y con viabilidad comercial, como el zapote amarillo (Nuñez *et al.*, 2004). La propagación vegetativa es uno de los medios importantes a fin de adelantar y homogenizar la producción. Pero, existen inconvenientes bioquímicos que afectan este tipo de propagación, tal es el caso de la síntesis de flavonoides, en especial la catequina, Esta molécula está presente de forma natural dentro de los tejidos de propagación de la planta, sin embargo, con fines de producción vegetal representa una problemática, ya que tiene un efecto de retardo o impedimento de la propagación (Feucht, 1990; Errea, 1992, 1998; Gonzáles 1999)

Por otro lado, hasta el momento no se han realizado estudios del sistema de propagación en zapote amarillo, en los cuales se consideren aspectos bioquímicos y microscópicos relacionados con la presencia de la catequina en los tejidos de propagación.

Por lo que en el presente estudio se propuso el objetivo de cuantificar bioquímica e histológicamente la presencia de catequina en tejidos de propagación de zapote amarillo, durante diferentes épocas del año para la determinación del período de tiempo adecuado de propagación.

2. ANTECEDENTES

2.1 La actividad frutícola

Hoy en día, el consumo de frutas tropicales está aumentando en los mercados nacionales e internacionales debido al creciente reconocimiento de su valor nutricional y terapéutico. Por lo tanto, las frutas juegan un papel importante en la economía, a través de la comercialización de sus productos, y nutricionalmente a través de su consumo (Cardoso *et. al*, 2011)

México se ha caracterizado por su producción frutícola; actualmente cuenta con 63 especies de frutas comercializadas y 220 especies con potencial, de las cuales está documentada su utilidad (Borys, 2001). Además, mantiene una balanza comercial positiva dentro del sector rural, ya que el volumen de frutas exportado fue 4.7 veces mayor que el importado desde 1961 a 2010 (FAO-FAOSTAT, 2013). La producción de los frutales prácticamente se ha duplicado de 1980 a la fecha, pasando de casi ocho millones a 18 millones de toneladas. Por otro lado, la fruticultura es una de las actividades agropecuarias más redituables, ya que la superficie cosechada con frutales representó el 6.44 % nacional, lo que retribuyó a un valor de su producción el cual fue 20.67 % del total de México, lo cual significa que cada hectárea cultivada con frutales, fue tres veces más redituable que el promedio del resto de los cultivos (SAGARPA-SIACON, 2013)

México tiene un mercado doméstico importante, con uno de los mayores consumos *per cápita* a nivel mundial, por lo que es necesario aprovecharlo como palanca de desarrollo de la fruticultura nacional. Estos recursos tienen un valor real destinado a la alimentación y la agricultura (Nuñez *et al.,*, 2004). Unos de estos recursos frutícolas corresponden a la familia de las sapotáceas, del cual se tienen establecidas 1,284 ha en el país, distribuidas en los estados de Yucatán, Chiapas, Guerrero, Michoacán, Tabasco, Veracruz y Morelos (SAGARPA-SIACON, 2013).

Su importancia económica por el momento es pequeña, pero tiene un gran potencial para el aumento en la producción y su comercialización (ICUC, 2004). Lo cual es de interés para la agroindustria y constituyen una fuente de ingresos para la población en el futuro próximo.

Estas frutas representan una oportunidad para los productores locales de tener acceso a mercados donde los consumidores aprecian el carácter exótico de estos productos y la presencia de compuestos bioactivos (Alves, 2008).

2.2 Antecedentes del género *Pouteria* sp

La familia Sapotaceae es de tamaño mediano, constituida por árboles y arbustos del bosque pantropical y conformada por alrededor de 450 especies en el neotrópico, distribuidas desde el sur de los Estados Unidos, México, Centro América, las Indias Occidentales, hasta Paraguay, Chile y Uruguay en Sur América. Es una familia presente en las zonas bajas de los bosques lluviosos, aunque algunas veces se le puede encontrar en zonas cálido-secas (Pennington, 1990).

Los miembros de la familia Sapotaceae presentan hojas agregadas en las ramillas terminales, a partir de las cuales se emiten las flores. El cáliz tiene cuatro a cinco sépalos verdosos y libres; la corola tubiforme en la base se abre en la parte superior en cinco pétalos. El androceo está constituido por dos verticilos, el exterior formado por estaminodios. El gineceo tiene cuatro o más carpelos, cada uno con un óvulo y con presencia de un estilo sencillo. Los frutos son bayas, con una o varias semillas. Todas las partes de la planta, aún los frutos, tienen abundantes canales de látex (León, 2000). Esta familia tiene importancia económica ya que se puede obtener látex para elaboración de goma de mascar a nivel comercial, madera durable y pesada, así como diferentes clases de frutos comestibles.

En el neotrópico se reconocen once géneros (Pennington, 1990): *Manilkara* (30 especies), *Sideroxylon* (46 especies), *Micropholis* (38 especies), *Chromolucuma* (2 especies), *Sarcaulus* (5 especies), *Elaeoluma* (4 especies), *Pouteria* (188 especies), *Chrysophyllum* (43 especies), *Ecclinusa* (11 especies), *Pradosia* (23 especies) y *Diploon* (1 especie). Los géneros más importantes que poseen especies con frutos comestibles son *Manilkara*, *Pouteria* y *Chrysophyllum*; el resto posee especies con frutos que se reportan como comestibles, pero sin importancia comercial. Además, los géneros *Manilkara*, *Micropholis*, *Pouteria* y *Ecclinusa* producen madera y látex con valor comercial (Pennington, 1990)

2.2.1 Clasificación y descripción de *Pouteria* sp

Comprende árboles o arbustos; estípulas ausentes. Hojas comúnmente arregladas en espiral, raramente opuestas; usualmente sin presencia de vena submarginal. Inflorescencias axilares o ramifloras, fasciculadas; fascículos simples u ocasionalmente arreglados a lo largo de una rama corta sin hojas. Flores comúnmente unisexuales. Cáliz de 4-6 sépalos libres; otras veces sépalos en número de 6-11 formando una espiral. Corola ciatiforme o tubular; tubo de igual tamaño o

más corto que los lóbulos, los cuales se presentan en número de 4-6. Estambres (4-6) soldados en la base o parte media baja del tubo, raramente libres, generalmente erectos e insertos; filamento corto; anteras extrorsas o lateralmente dehiscentes, usualmente glabras; estaminodios en igual número que los lóbulos de la corola, pocas veces en menor número o ausentes; disco raramente presente. Ovario de 1-6 carpelos, locular con placentación axilar; estilo inserto. Fruto una baya con una a varias semillas. Semilla elipsoide, plano-convexa, con forma de un gajo de naranja o bien lateralmente comprimida; escama adaxial usualmente de la longitud de la semilla (Pennington, 1990).

El género está constituido por ocho secciones (Pennington, 1990): Franchetella, Oxythece, Oligothecha, Rivicoa, Antholucuma, Pouteria, Aneulucuma y Gayella. Las especies de interés de esta monografía pertenecen a las secciones Rivicoa (*P. campechiana*) y Aneulucuma (*P. sapota* y *P. viridis*). La sección Rivicoa tiene 4 a 5 sépalos mientras que la Aneulucuma posee de 6 a 11 sépalos

Pouteria campechiana (H. B. K) Baehni

Sinónimias:

- *Lucuma campechiana* Kunth in Humboldt, Bonpland & Kunth,
- *Lucuma nervosa* A. de Candolle in A.P. de Candolle
- *Radlkoferella sphaerocarpa* (A. de Candolle) Pierre
- *Pouteria laeteviridis* (Pittier) Lundell, Wrightia

Pennington (1990).

Cuadro 1. Nombres comunes del fruto de *Pouteria campechiana*

País	Nombre común/vernacular
Belice	mamee ciruela, mamey cerera, mamey cerilla
Colombia	fruta de huevo, zapote amarillo
Costa Rica	zapotillo, matasán, matasano, siguapa
Cuba	ties, canistel
El Salvador	guicume, guaicume, zapotillo amarillo
Filipinas	borracho, canistel, toesa, tiessa
Florida, EEUU	egg-fruit, canistel, yellow zapote, ti-es
Guatemala	canistel, caca de niño, caniste zapotillo, kakixo, zapotillo blanco, zapuyul, limoncillo, zapotillo de montaña
Honduras	canistel, zapotillo, zapote amarillo, narraco
México	Caniste (viene del Kanité), guacamo, huecamo, hicama, huicume, kanixte, mante, ocotillo, zapote amarillo, zapote de niño, zapote, borracho, mamey de Campeche, cucumo y caca de niño (totonaco, Región de Totonacapan, Veracruz); zbul, costizapot (náhuatl)
Nicaragua	zapote de mico, zapotillo, zapote amarillo, zapote calentura, zapote yema de huevo, zapote de chancho, caca de niño, tamalake, matasano, eggplant
Panamá	Nisperillo
Puerto Rico	huevo vegeta

Clasificación:

- *Reino:* Plantae
- *Subreino:* Plantas Tracheobionta - vasculares
- *Superdivisión:* Plantas Spermatophyta - Semilla
- *División:* Magnoliophyta plantas de floración
- *Clase:* Magnoliopsida - Dicotiledóneas
- *Subclase:* Dilleniidae
- *Orden:* Ebenales
- *Familia:* Sapotaceae - Familia Zapote
- *Género:* Pouteria
- *Especie:* *Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni
- Nombre común más utilizado: Canistel y Zapote amarilloFuente:

Pennington (1990)

2.2.2 Descripción botánica

Arboles: perennifolios, que en Centro América alcanzan hasta 25 metros de altura y diámetro a la altura del pecho (DAP) de 95 cm, tronco recto con las ramas delgadas y ascendentes, ramificación simpódica, copa irregular. La corteza es finamente fisurada, grisácea o moreno pardusca, con abundante látex.

Madera: albura pardo-amarillenta, duramen de color café grisáceo a café rojizo, no bien demarcado y usualmente no claramente diferenciado de la albura, con poco lustre, sin olor, sabor algunas veces astringente, moderadamente o muy pesada y dura; densidad específica 0.7 - 1.1 g/cm³, textura media, uniforme, grano típicamente recto, ocasionalmente ondeado (Aguilar y Aguilar, 1992). Se considera una madera dura (Pennington y Sarukhan 1968).

Hojas: sencillas, alternas, agrupadas en los extremos de las ramas, espiralmente arregladas, forma elíptica, ápice agudo o redondeado, base atenuada o cuneada, nervadura central prominente en el haz, 9 a 18 pares de venas secundarias, hojas de color verde claro brillante en la cara superior y verde claro en la inferior, pecíolos de 5 a 25 mm de largo, glabras, láminas de 8 a 25 cm de largo por 2.5 a 6 cm de ancho.

Flores: de color blanco verdoso, perfumadas, en fascículos axilares, pedicelos de 5 a 8 mm de largo, 5 a 6 sépalos verdes de 0.45 a 1.1 cm de largo; corola verde clara de 7 a 8 mm de largo, con 5 lóbulos, 5-7 estambres, opuestos a los lóbulos de la corola, fusionados a la parte superior del tubo de la corola; 5-7 estaminodios; ovario ovoide o cónico, 5-7 lóculos, pubescente, estilo grueso, glabro, de igual tamaño que la corola.

Fruto: elipsoide a subgloboso con cáliz persistente, ápice agudo, base obtusa, la cáscara es delgada, la pulpa amarilla, aromática, un poco seca y con látex blanco pegajoso, hasta 7 cm de largo y 3 a 5 cm de ancho.

La pulpa del fruto es de color amarillo (Figura 3) con una a cuatro semillas duras. Los frutos tienen de 7.5 a 12.5 cm de longitud y de 5 a 7.5 cm de ancho; la fruta puede consumirse fresca o después de la cocción y también se puede utilizar en la elaboración de pulpas, helados, licuados y mermelada. El valor nutricional es un factor importante que lleva a un interés en el consumo de esta fruta (Agostini et. al., 2003). Nutricionalmente posee compuestos carotenoides,

polifenoles biológicamente activos y otros antioxidantes, como el ácido gálico, (+) - galocatequina, dihidromiricetina, myricitrina (Ma, 2004; Agostini *et. al.*, 2010).

Semilla: tres a cinco, ovaladas, de color negro o café brillante con un hilio conspicuo; embrión plano convexo, cotiledones libres (Standley y Williams, 1967; Pennington y Sarukhan, 1968; Pennington, 1990; Balerdi, 1998).

Polinización y formación del fruto: no se conoce reportes referentes a polinizadores en esta especie, sin embargo, se cree que es una especie alógama. Observaciones generales realizadas en materiales silvestres y cultivados en Guatemala indican que la formación del fruto lleva más de un año. Los materiales en estado silvestre de Guatemala fructifican en los meses de noviembre y diciembre, mientras que los cultivados de Nicaragua y Costa Rica lo hacen en los meses de junio a agosto (Azurdia, 2004).

2.2.3 Distribución

En México crece en forma silvestre en la vertiente del Golfo desde el sur este de San Luís Potosí y el norte de Puebla y Veracruz hasta la península de Yucatán, y en la del Pacífico desde Nayarit hasta Chiapas formando parte de las vegetaciones naturales que cubren dicha área (Pennington y Sarukhan, 1968).

En Centro América es más abundante en la parte norte de Guatemala, creciendo en el bosque tropical lluvioso, pero su presencia se extiende hasta Panamá (Pennington, 1990). La distribución de materiales cultivados en Centro América ya sea dentro de huertos familiares o bien como parte de sistemas agroforestales, es mostrada por Azurdia en el 2004. Fig. 1.

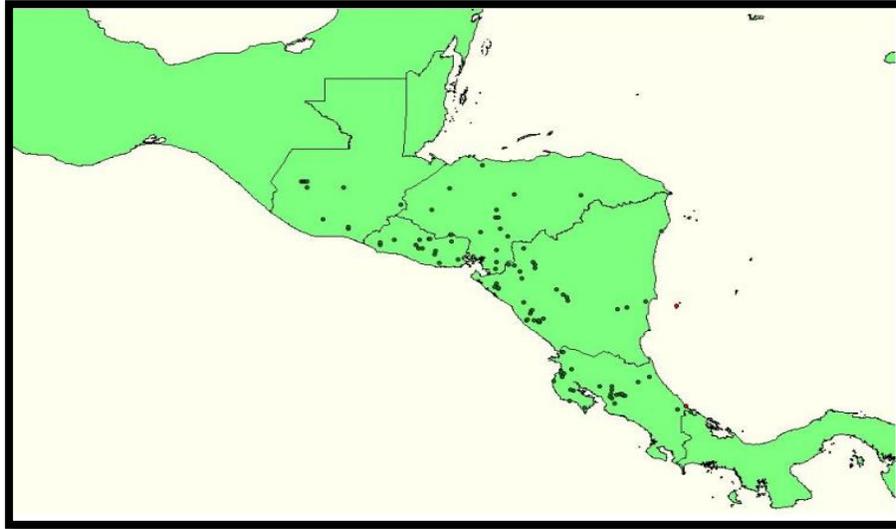


Figura 1. Localidades en las que se reportan árboles cultivados de *Pouteria campechiana* en Centro América

Fuente: Azurdía (2004)

Pennington (1990) muestra un mapa de distribución de poblaciones silvestres en el que se incluye el sur de México (Figura 2)

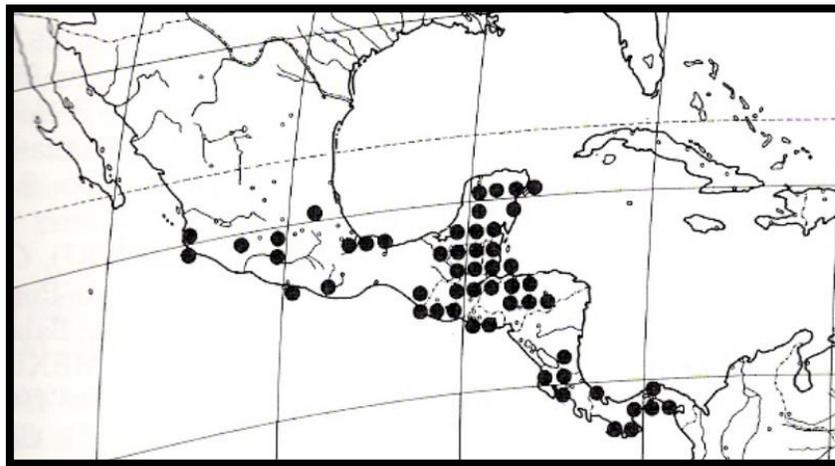


Figura 2. Distribución de *Pouteria campechiana* silvestre en México y centro América

Fuente: Pennington (1990)

Se puede encontrar *P. campechiana* cultivado en La Florida y Hawai (EEUU), Cuba (principalmente Pinar del Río), Bahamas, Puerto Rico, Jamaica, Filipinas y Venezuela (Morton, 1987)

2.2.4 Cultura histórica de *Pouteria campechiana*

Existe poca información sobre la historia de *P. campechiana* durante la época precolombina, sin embargo, se reconoce que era parte de la cultura Mesoamericana ya que en la actualidad aún persisten nombres mayas para esta especie (kaniste, cantes, huicomo y otros). De esta región fue distribuido a otras regiones tropicales del mundo. Por ejemplo, Esquivel y Hammer (1992) mencionan que en 1516 fue introducido a Cuba el primer grupo de indígenas procedentes del área maya, al igual que durante dicha época se incrementó el comercio entre la región mesoamericana y Cuba. Continúan diciendo que el 44.7% de los nombres indo americanos de origen maya y nahuatl utilizados en el idioma castellano de Cuba corresponde a nombres de plantas, dentro de los cuales está incluido el canistel. Esto permite asumir que existe la posibilidad que canistel fue introducido a Cuba durante dicha época. Semillas de Cuba fueron plantadas en el jardín experimental Lancetilla, en la Lima, Honduras en 1927. En 1957 el Dr. Víctor Patiño compró frutas de zapote amarillo en un mercado de la Habana, Cuba y las sembró en la estación agrícola experimental de Palmira, Colombia (Patiño, 1963). Más tarde (1963) Patiño reporta que varios árboles estaban creciendo bien. Antes de 1924 el zapote amarillo fue introducido a elevaciones bajas en las Filipinas y también llegó a Hawai alrededor de la misma época. Intentos de cultivarlo en Singapur no fueron exitosos. En 1549 habían algunos árboles plantados en África del Este (Morton, 1987).

2.2.5 Áreas de producción actual de *P. campechiana*

En el área de origen *P. campechiana* tiene relativamente poca importancia. No se cuenta con ninguna información de producción en México, a pesar que se encuentra frecuentemente en el sur-este, especialmente en la península de Yucatán (Sauri, 2001).

En Guatemala la producción estimada es de 32 toneladas, estimándose una pérdida del 40% por pérdidas post-cosecha. La producción proviene principalmente de árboles creciendo en huertos familiares y de algunos ejemplares creciendo en forma silvestre (IPGRI, 1997). En Honduras la

producción reportada es de 87 toneladas (DICTA, 1997),. Para el caso de Costa Rica, se reporta apenas una producción de 0.63 toneladas (Universidad de Costa Rica, 1997).

A pesar de haberse introducido el zapote amarillo a Florida en el siglo XIX, solo se reporta cultivada en menos de 1 ha (Crane, 1993). Sin embargo, es una especie frecuente, considerándose como naturalizada. En las Filipinas es una especie muy frecuente en huertos familiares. Se reporta que la producción nacional es de 11 mil toneladas, lo cual representa el 0.03% de los frutos y nueces producidas en el país (Coronel, 2002).

Las áreas con clima cálido húmedo resultan ser las adecuadas para el desarrollo del canistel. Sin embargo, se le puede encontrar frecuentemente en áreas con clima cálido seco como lo es la parte norte de la península de Yucatán. Es reconocido que esta especie puede prosperar bien en áreas con clima cálido y con bajos requerimientos de humedad (Morton, 1987). Áreas potenciales para su cultivo son regiones tropicales como Florida, los callos de Florida, las islas del Caribe (Cuba, Bahamas, Puerto Rico, República Dominicana), Colombia, Venezuela y Brasil en América; Filipinas, Malasia y Vietnam en Asia, y en los países del centro de Africa.

2.2.6 Condiciones climáticas para el cultivo de *P. campechiana*

Pouteria campechiana es una especie que se adapta a condiciones de climas tropicales y subtropicales en bajas y medianas altitudes sobre el nivel del mar. En general se considera que esta especie está bien adaptada a climas libres de heladas (Martín y Malo, 1978). Crece bien en las condiciones subtropicales del sur de Florida en donde su expansión está limitada solamente por aquellas áreas con heladas severas. En general se considera que esta especie es ampliamente adaptable, por lo que es recomendable sembrarla en todas las partes de los trópicos y subtrópicos (Martín y Malo, 1978) En su área de origen se puede encontrar en el trópico seco y trópico húmedo. Por ejemplo, en Guatemala se encuentra en forma silvestre a una altitud promedio de 300 msnm bajo condiciones de clima tropical húmedo. En forma cultivada se encuentra tanto en el trópico seco como en el trópico húmedo, por ejemplo, en El Salvador a un promedio de 659 msnm de altura con un rango de 120-1120 msnm; en Honduras, 720 msnm y rango de 20-1390 msnm; Nicaragua, a 375 msnm y rango de 18-800 msnm; en Costa Rica, 339 msnm y un rango de 5-1200 msnm (Azurdia, 2004). El rango ideal, basado en las experiencias en Centro América, es de 0 a 800 msnm.

2.2.7 Requerimientos de *P. campechiana*

Agua

Esta especie es tolerante a estaciones secas pero desarrolla de mejor manera con suelos con humedad adecuada (Sauls y Campbell, 1994). *P. campechiana* no se adapta bien a zonas con anegamiento. Las poblaciones silvestres de la Biosfera Maya, Petén, Guatemala crecen bajo condiciones de un bosque subtropical cálido, con una precipitación de 1281 mm al año (Aguilar y Aguilar, 1992).

Temperatura

Es una especie ligeramente resistente a las bajas temperaturas tal como lo es el chicozapote (*Manilkara zapota*) que es originario de la misma región. Sin embargo, los árboles pequeños pueden ser dañados considerablemente a temperatura de $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$, comparado con árboles grandes que pueden soportar temperaturas de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por periodos cortos (Sauls y Campbell, 1994). En condiciones silvestres, la temperatura promedio en la cual crece esta especie es de $25.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ como es el caso de la Biosfera Maya en Peten, Guatemala (Aguilar y Aguilar, 1992). Temperatura óptima podría ser de $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ según la experiencia ganada en Centro América.

Luz

En condiciones silvestres esta especie crece bien bajo el dosel del bosque tropical lluvioso, por lo tanto, en sus primeros estados de desarrollo no requiere de grandes cantidades de luz. En estado adulto, no alcanza más de 25 metros de altura por lo cual no es parte de la copa de los árboles que dominan el bosque tropical lluvioso. Sin embargo, crece bien en áreas abiertas del bosque, bajo condiciones de sombra regulada cuando está asociado al cultivo de café, o bien a pleno sol en monocultivo. Se ha observado en la colección de campo que se encuentra en una de las estaciones experimentales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, que los árboles tienen un crecimiento rápido cuando están a pleno sol. Su tasa de crecimiento es mayor que la observada en colecciones de zapote bajo similares condiciones.

Viento

Los árboles no resisten vientos fuertes, inicialmente las hojas son dañadas y posteriormente los árboles pueden quebrarse o ser arrancados completamente.

Suelo

Crece bien en un amplio rango de tipos de suelos. Son recomendables los suelos profundos y bien drenados, sin embargo, puede adaptarse a suelos que varían de ácidos arenosos a rocosos alcalinos (Sauls y Campbell, 1994). En los cayos de Florida esta especie crece bien en suelos de baja fertilidad, arenosos profundos o calcáreos poco profundos, con deficiencias en microelementos que resultaría ser un problema para otros árboles frutales tropicales (Martín y Malo, 1978).

El área en la cual es abundante en la Biosfera Maya corresponde a los suelos conocidos como Vertisoles, los cuales son profundos, en áreas de relieve plano, desarrollados a partir de roca calcárea suave, generalmente mal drenados, sin evidencias de erosión (Aguilar y Aguilar, 1992). En México se encuentra en suelos derivados de material calizo o bien ígneo (Pennington y Sarukhan, 1968).

Fitosociología

Es una de las especies más importantes de la Biosfera Maya, Aguilar y Aguilar (1992) mencionan que en la asociación edáfica de Tikal, en jerarquía de importancia el canistel ocupa el quinto puesto, por debajo de *Guarea* sp., *Trichilia moshata*, *Brosimum alicastrum* y *Sabal morrisiana*. Por otro lado, Ricker y Daly (1998) mencionan que el canistel se encuentra en una densidad de menos de 1 árbol/ha en el bosque de los Tuxtla, Veracruz, México.

En Centro América es más frecuente creciendo en huertos de frutales, en asocio con café y en huertos familiares. Por ejemplo, en Honduras el 62% de las accesiones estudiadas estaban en huertos frutales; en El Salvador, el 45% estaba presente en huertos frutales y el 30% en asocio con el cultivo del café (Azurdia, 2004)

La parte que más se utiliza es el fruto, razón por la cual se han hecho algunos trabajos para determinar su composición química. De las otras partes de la especie poco se sabe.

2.2.8 Descripción del fruto de *P. campechiana*

Pulpa

La pulpa del fruto de zapote amarillo contiene carotenoides (reconocidos por actividad antioxidante), especialmente neoxantina y violaxantina que presentan niveles comparables a los

encontrados en las frutas de mamey (Torres-Rodríguez *et al.* 2011; Costa *et al.*, 2010) y también con alimentos con amplio consumo mundial, como los cítricos (Carmona *et al.*, 2012).. El contenido de proteína no es alto, por lo cual esta debe de suplementarse por medio de otros alimentos. El contenido nutricional sobrepasa el contenido nutricional de la carambola, excepto en contenido de humedad, fibra y riboflavina (Morton, 1987).

Semilla

Se sugiere que la semilla de tiene derivados similares a los presentes en la semilla de *P. sapota*, por lo cual esta puede ser un sustituto en la obtención de medicamentos que reduzcan la dermatitis seborreica en la cabeza (Morton, 1987).

Madera

Presenta haces interiores color moreno-rojizo, de grano fino, textura media, compacta, fuerte, resistente, durable, usual en construcción y carpintería. El peso específico es de 0.80 a 1.10 g/cm³ (Aguilar, 1966). *P. campechiana* forma parte de la vegetación natural en la cual crece *Pouteria sapota*, por esta razón, se le puede dar un manejo similar al enriquecimiento para *P. sapota* (Ricker *et al.*, 1999, Ricker, 2000).

En México y Centro América no existen plantaciones comerciales en monocultivo. Lo frecuente es que los árboles se cultiven en sistemas agroforestales con café, en huertos frutícolas o bien en huertos familiares, y algunas otras veces asociado a especies forestales. En todos los casos, estos ecosistemas tratan de imitar de alguna manera los bosques naturales en los cuales crece. Por lo tanto, estos sistemas artificiales ayudan en la retención de humedad en el suelo, conservan el suelo y permiten el mantenimiento de la riqueza vegetal.

Por su rápido crecimiento se utiliza para delimitar huertos frutícolas o huertos familiares. En la Florida crece en forma rural o bien conformando manchones de vegetación. Se ha indicado que esto se debe a que tiene crecimiento vigoroso y puede invadir áreas sin vegetación. Esta característica puede ser positiva si se piensa en esta especie como una posibilidad para reforestar áreas abandonadas.

En el caso que se establezcan plantaciones en monocultivo bien se puede asociar a *P. campechiana* cultivos anuales durante los primeros tres años de la plantación. En el área Mesoamericana se puede asociar con maíz, frijol, yuca, camote, chile.

La parte que más se utiliza es el fruto, el cual se consume en forma fresca. Sin embargo, por su dulzor y olor produce empalago a algunas personas (Sauri, 2001). En localidades de Florida se acostumbra comer el fruto fresco con la adición de mantequilla o jugo de limón, lo cual se supone que mejora el sabor (Sauls y Campbell, 1994). También la pulpa se puede utilizar para elaborar pasteles, licuados y helados.

En Nicaragua la semilla puede ser un sustituto de la semilla de zapote cuando se elabora la llamada cajeta de zapoyol (Universidad Nacional Agraria, 1977).

Desde el punto de vista nutricional el contenido de vitamina A es alta, y el jugo que contiene 100 g de pulpa de zapote amarillo puede suministrar el 15% de la necesidad diaria de consumo de vitamina A para los niños (Agostini *et al.*, 2010).

Se han introducido y mantenido en colección varios de los principales cultivares de esta especie, procedentes de Florida. Estos son: Trompo, Oro, Bruce y Ross. Los frutos maduran dependiendo de las variedades, principalmente en primavera-verano, ocurriendo también alguna producción fuera de época. El peso del fruto varía entre 150 y 500 g siendo los de Ross los más pequeños y los de Bruce los mayores.

La cocción de la corteza de *P. campechiana* se toma como febrífugo en México y se aplica sobre erupciones de la piel en Cuba. En el extracto de hojas de *P. campechiana* se identificaron estilbenoides y flavonoides, también se comprobó la actividad antimicótica del extracto y la preparación de las semillas se ha empleado como un remedio para las úlceras, Por otra parte, estilbenoides y flavonoides glucósidos fueron previamente identificados a partir de extractos de hojas de *P. campechiana* y se comprobó su actividad antimicótica. También, la preparación de las semillas ha sido empleada como un remedio para las úlceras y como hepatoprotector (Hernández *et al.*, 2008; Kubola *et al.*, 2010; Aseervatham *et al.*, 2013).



Figura. 3. Fruto de *Pouteria campechiana*

2.3 La propagación vegetativa

La reproducción vegetativa (propagación vegetativa, la multiplicación vegetativa, la clonación vegetativa) es una forma de reproducción asexual en las plantas, en donde se utilizan partes de la planta para formar un nuevo individuo. Este tipo de propagación, su principal ventaja es la reproducción idéntica de plantas con características deseables como la alta productividad, y la conservación de características de importancia comercial, al contrario de la propagación sexual en donde la descendencia es variable. Se puede realizar por medio de esquejes, estacas en diferentes estados de madurez, injertos y por cultivo *in vitro*. Esto se debe a que las células de los tejidos vegetales conservan la potencialidad de multiplicarse, de diferenciarse y dar origen a diversas estructuras como tallos y raíces. Estos grupos celulares forman parte de meristemos primarios y secundarios que pueden encontrarse en todos los órganos de las plantas (Shanfa y Yanru, 1999; Hudson, 2002; Rojas *et al.*, 2004)

También conocida como propagación indirecta o agámica, se efectúa con partes de una planta, provista de yemas y con capacidad de enraizamiento para originar nuevos individuos o insertando dichas yemas a otras plantas afines y capaces de soldar sus tejidos para proseguir su desarrollo normal. De esta manera puede asegurarse la plena transmisión de los caracteres fijos de una variedad vegetal (Sáenz y Sánchez, 1993).

Además en algunos casos, existen especies que no producen semillas o producen muy pocas, es por eso que se escoge la reproducción vegetativa porque es fácil y rápida o porque se busca reproducir fiablemente las características de una planta (Chamba, 2002).

La propagación tiene tres variantes, que son: la micropropagación a partir de tejidos vegetales en cultivo *in vitro*, la propagación a partir de bulbos, rizomas, estolones, tubérculos, o segmentos (esquejes y estacas) de las plantas que conserven la capacidad de enraizar la propagación por injertos de segmentos de la planta sobre tallos de plantas receptoras más resistentes (Vásquez *et al.*, 1997)

En la propagación por esquejes y estacas, una parte del tallo, se separa de la planta madre, se coloca bajo condiciones ambientales favorables y se le induce a formar raíces y tallos, produciendo así una nueva planta independiente, que en la mayoría de los casos es idéntica a la planta de la cual procede (Huanca, 2001). La propagación por estacas consiste en cortar ramas las cuales se colocan en una cama enraizadora, con el fin de lograr la emisión de raíces y brotación de la parte aérea, hasta obtener una nueva planta (Rojas *et al.*, 2004).

Este es el método más importante para propagar plantas y se usan ampliamente en la propagación comercial en invernadero de muchas plantas con flores de ornato y se usa en forma común para propagar diversas especies de frutales. A través de la propagación de esquejes y estacas se pueden iniciar muchas plantas en un espacio limitado, partiendo de unas pocas plantas madres, este es un método poco costoso, rápido y sencillo; puesto que no necesita de técnicas especiales a emplear (Huanca, 2001). Además, lo importante de este tipo de propagación es la homogeneidad de las nuevas plantas obtenidas, y se conservan las características genéticas (Rojas *et al.*, 2004).

El material de propagación puede dividirse en tres grupos, de acuerdo con la naturaleza de la madera usada: esquejes, estacas de madera dura, y estacas de madera semidura. Los esquejes se cortan cuando el crecimiento apical de los brotes se ha hecho lento pero todavía están verdes, las estacas de madera semidura se cortan cuando el crecimiento ha disminuido y los tallos son más gruesos y fuertes, y las estacas de madera dura se toman cuando las ramas están ya leñosas (Norma, 1983).

En este tipo de propagación se obtienen segmentos de ramas que contienen yemas terminales o laterales, con la mira de que al colocarlas en condiciones adecuadas, produzcan raíces adventicias y, en consecuencia, plantas independientes. El tipo de madera, el período de crecimiento usado para hacer los esquejes y estacas, la época del año en que se obtengan, y otros factores pueden ser de mucha importancia para asegurar el enraizamiento satisfactorio. La información concerniente a esos factores se da aunque parte de ese conocimiento puede conseguirse en la práctica misma de propagar plantas (Huanca, 2001).

Los esquejes por lo general responden bien al trasplante, tienen un porcentaje elevado de supervivencia, y se consideran como una de las mejores bases para alcanzar plantas de calidad, de las plantas multiplicadas por esqueje se logra obtener una gran cantidad de plantas de una sola planta madre; pero además también nos permite propagar las buenas características individuales, identificar la variedad y mantener la calidad sanitaria (Carazo, 2005).

La propagación vegetativa en especies de frutales tiene limitantes como por ejemplo, no hay investigaciones que permitan confiabilidad desarrollar sistemas de propagación de especies con frutales exóticos, y con potencial comercial, como por ejemplo el zapote amarillo (Campbell, 1992; Paredes, 1997). Por otro lado, a pesar de su utilidad, la evaluación de la propagación vegetativa en esquejes y estacas de zapote amarillo es escasa, y algunos reportes concluyen que las estacas de madera semisuave y esqueje tienen un 60 % de enraizamiento. Pero, existen diferencias en la capacidad de enraizamiento entre cuatro genotipos de zapote amarillo, encontrándose además que la mejor respuesta obtenida fue añadiendo una concentración de 3 mgL⁻¹ de ácido indolbutírico.

2.4 Compuestos involucradas en el retardo o impedimento de la propagación vegetativa

Las investigaciones sobre la propagación vegetativa fueron iniciadas porque constituyen una solución en la práctica de la fruticultura; así mismo, las plantas producen y almacenan un amplio número de compuestos metabólicos secundarios (alcaloides, terpenos, compuestos fenólicos, flavonoides, entre otros) que varían en su biosíntesis, concentración y localización de acuerdo con cada especie y época del año (Beltrán, 1997), y estos tienen efecto sobre la propagación. Las plantas naturalmente sintetizan catequina (flavon-3-oles) que tienen como función el repeler

insectos y fitopatógenos y como mecanismo de protección para objetos y sustancias extrañas, sobre todo cuando existe algún tipo de daño en el floema y xilema.

Las catequinas pertenecen al grupo de los flavonoides derivados de la fenilalanina y la tirosina (Harborne, 1982), se encuentran en las plantas de forma natural particularmente en la pared celular, actúan en la defensa química antimicrobiana e inducen resistencia a la infección por patógenos y la radiación UV (Metraux y Raskin, 1993).

La evidencia de los compuestos fenólicos involucrados en la oposición a la propagación vegetativa tiene su antecedente en árboles de cerezo, Treuter y Feuch, 1986, investigaron la presencia de la prunina y el glucósido p-cumaril y concluyeron que estos se localizan en el floema de *Prunus avium* sobre *Prunus cerasus*. Aunque se ha observado una alta concentración de catequinas en el sector floema/cambium vascular justamente arriba de la unión del injerto (Treuter y Feuch, 1991). Por otro lado, la unión débil del injerto se le atribuye a la presencia de compuestos fenólicos, es posible que la catequina y otros fenoles que llegan a acumularse en la unión del injerto, pudiera ser la primera respuesta de la incompatibilidad (Decomann *et al.*, 1996).

Estudios realizados por Decooman (1996) muestran la presencia de catequina cuando existe la incompatibilidad entre injertos, localizan en el área de microinjertos *in vitro* de *Eucalyptus gunnii* L se encontró una acumulación de ácido gálico, p-cumárico y catequina.

También se ha demostrado que los flavonoides monoméricos como las catequinas y los oligoméricos como las proantocianinas presentan oxidación, concentrándose en el área del floema y el *cambium*, las catequinas y otros compuestos del mismo grupo en cortes de *Prunus avium* se observan en un color negrozco, producto de las reacciones oxidativas (Schmid y Feucht, 1980; Feucht y treutter, 1990).

Por su parte, Errea (1992) reportó en cultivares de chabacano sobre especies de *Prunus* una acumulación excesiva de flavonoides: catequinas y epicatequinas en la parte media de la unión.

Los compuestos fenólicos se encuentran en un 10% del área de contacto en injertos de *Prunus armeniaca* L. En portainjertos de ciruelo (*Prunus* spp.), se presentó una alta acumulación de fenoles entre ellos la catequina en las combinaciones incompatibles (Errea, 2001).

En injerto de guanábana (*Annona muricata* L.) por los métodos de astilla y enchapado lateral sobre portainjertos de la misma especie, se encontraron diferencias significativas en altura de planta y en el porcentaje de prendimiento; en este estudio el injerto por enchapado lateral resultó ser el mejor, aunque con bajo porcentaje de prendimiento (Ponce, 1979).

Estudios de injertos con guanábana presentaron incompatibilidad entre injertos, mostrando características anatómicas como depósitos de taninos, fitoalexinas y de polifenoles, ausencia funcional del xilema y desprendimiento del injerto.

En el estudio realizado por Vidal (2000) en injertos de guanábano sobre guanábano espinoso y chirimojo observó necrosis celular, vasos desintegrados, proliferación parenquimática incoherente y los radios se encontraban desorganizados.

Injertos entre pera y membrillo presentan incompatibilidad; sin embargo aún no está comprendida; los síntomas externos y las anomalías anatómicas se describen pero existe poca información acerca de las causas y la evolución de este fenómeno (Musacchi, 1997). Las causas de incompatibilidad observadas en injertos de melocotón sobre *Prunus tomentosa* también son desconocidas, sucede que a menudo se desarrollan normalmente, aunque después de cuatro años los árboles mueren súbitamente (Salvatierra *et al.*, 1999).

En el caso de una incompatibilidad retrasada, es posible que inicialmente los compuestos fenólicos sean inofensivos, y que al irse incrementando progresivamente producen un desbalance en la zona de injerto. El movimiento de estos compuestos dentro de los tejidos de las células del injerto y del portainjerto llegan a producir irregularidades metabólicas (Jonard, 1990).

Las relaciones entre el metabolismo de los fenoles en la propagación vegetativa en árboles de *Prunus* fue estudiada por Gebrardt y Feucht (1982), ellos observaron que en combinaciones compatibles se presentó una baja acumulación de polifenoles cerca de la unión del injerto y en combinaciones incompatibles un aumento de fenoles totales. Éstos investigadores señalaron que un incremento de polifenoles es un síntoma de incompatibilidad que por lo regular está acompañado de una capa negra localizada en el floema. Tissut *et al.*, (1980) reportaron que la acumulación de polifenoles podría tener consecuencia en la inhibición de la respiración.

En los *Prunus* se ha demostrado que los flavonoides causan efectos en la diferenciación celular (Feucht, 1988); así también, producen diferencias cuantitativas y cualitativas en los compuestos fenólicos formados entre las uniones del injerto (Yuri, 1990)

Castro (1999) determinó la época con el menor contenido fenólico que permitió la micropropagación del chirimoyo. Se realizaron determinaciones mensuales de la concentración de fenoles en los tejidos de propagación y se encontró que en el mes de junio se encontraron los niveles más bajos de fenoles y los mayores en los meses de agosto y septiembre, en estos meses va disminuyendo su crecimiento vegetativo y la lignificación va en aumento.

González (1999) realizó la propagación de chicozapote *Achras sapota*, en tres épocas del año, mayo, agosto y septiembre, probó cinco métodos de injerto, las varetas fueron terminales seleccionadas por su vigor y sanidad, injertaron el mismo día de su corte, sobresale el enchapado lateral con prendimiento de 99%, y la mejor época para injertar resultó ser en el mes de mayo y la menos adecuada fue la de septiembre; con esta misma especie.

2.5 Técnicas de detección de flavonoides

Las especies frutales son ricas en flavonoides y contienen distintas estructuras, los descubrimientos de esos flavonoides con técnicas de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC: high performance liquid chromatography) han dado a conocer cerca de veinte compuestos en el floema de *Prunus* sp, el reconocimiento sobre las diversas estructuras de los flavonoides es de interés particular por su papel en la fisiología y en los procesos de propagación. Además, muchos cambios que afectan la difusión y el movimiento de los compuestos fenólicos están involucrados en el daño celular y tienden a alterar el sistema completo del floema (Errea *et al.*, 1994; Feucht y Treutter, 1991).

Booy (1995) con la técnica de HPLC identificó compuestos fenólicos en cultivares de Gerbera, analizó antocianinas y flavonoides pigmentados. Marx y Fabricius (1997) determinaron por esta misma técnica sustancias contenidas en guaraná, usaron metanol para la extracción y una columna C₁₈ para la separación y detección de catequina y epicatequina entre otros compuestos. Se han extraído compuestos fenólicos presentes en la epidermis y parénquima de manzana (*Malus domestica*) a partir de material seco y por medio de extracciones sucesivas con solventes,

el extracto de metanol fue analizado por HPLC acompañado con un diodo para la detección; concluyeron que las procianidinas fueron los constituyentes fenólicos predominantes y corresponden a estructuras polimerizadas (Guyot, 1998).

Se reportó la localización de catequinas en el floema del olmo (*Ulmus minor*) y cerezo, fueron determinadas histoquímicamente por el uso de un reactivo el 4 dimetilaminocinnamaldehido (DMACA), las dos especies de árboles mostraron distribución característica de fenoles, que abundan en los radios del floema, la determinación y separación fueron realizadas por la técnica de HPLC y con DMACA como reactivo colorante (Feucht, 1992).

Treutter (1994) desarrolló un método para caracterizar flavon-3-oles entre ellos la catequina y epicatequina por HPLC, con una línea de detección UV y detención de reacción química, la derivatización postcolumna de los polifenoles con 4-dimetil-amino-cinnamaldehido DMACA, en presencia de ácido sulfúrico mejoró la sensibilidad.

La técnica de HPLC ha sido utilizada para diversas determinaciones, de calidad como la de Lin (1998) que desarrolló un procedimiento de HPLC para la determinación simultanea de 6 compuestos flavonoides (catequina, ácido gálico y tres metilxantinas) en extracto acuoso de té en 15 téis chinos y 13 téis japoneses verdes. Así también Saijo y Takeda (1999) condujeron estudios para determinar la existencia de catequinas y formas epiméricas de catequinas en varios géneros de té verde por medio de HPLC.

3. JUSTIFICACIÓN

De los árboles frutales con potencial comercial se encuentra *Pouteria campechiana*, este árbol produce madera utilizable, es usado como ornato y produce un fruto tropical exótico, que por su exquisito sabor y propiedades nutrimentales puede tener un gran potencial en el mercado; su propagación vegetativa daría como resultado la conservación de los árboles con las mejores características. La información científica sobre propagación vegetativa es insuficiente, posiblemente se deba a impedimentos bioquímicos, como la presencia de catequina (sustancia involucrada en el retardo de la propagación vegetativa). Por lo que es necesario obtener datos y sugerir la época adecuada para la recolección de material de propagación vegetativa (esqueje, estaca de madera semidura y estaca de madera dura) basados en el nivel más bajo de catequina, de esta manera, se podrá establecer relaciones necesarias y formular una estrategia de propagación que redunde en un alto índice de éxito; así apoyar al sector agrícola y en particular a los productores de frutales, dando la información apropiada para desarrollar sistemas de propagación.

4. HIPÓTESIS

La presencia de catequina es variable en las diferentes épocas del año en el material de propagación de zapote amarillo (*Pouteria campechiana*) por lo que la determinación de la época en donde la concentración de catequina sea menor se relacionará con un periodo de tiempo adecuado para coleccionar el material de propagación

5. OBJETIVOS

Objetivo general:

Cuantificar bioquímica e histológicamente la presencia de catequina en material de propagación (esquejes, estacas de madera semidura, estacas de madera dura) de *Pouteria campechiana* durante diferentes épocas del año para determinar el período de tiempo adecuado para coleccionar el material de propagación.

Objetivos específicos:

- Verificar la diferencia de concentración de catequina en los diferentes órganos de propagación (esquejes, estacas de madera semidura, estacas de madera dura).
- Seleccionar el método de extracción óptimo para evaluar la concentración de catequina.
- Cuantificar la cantidad de catequina en diferentes épocas del año mediante HPLC.
- Determinar el método de tinción con DMACA para la observación de catequina en cortes histológicos y evaluar los depósitos de catequina mediante análisis de imágenes en diferentes épocas del año.
- Estimar el período conveniente para la propagación de acuerdo a la menor concentración de catequina.

6. METODOLOGÍA

6.1 Localización geográfica del cultivo de *Pouteria campechiana*.

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de propagación *ex-vitro* del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI), del Instituto Politécnico Nacional, ubicado en Yauhtepec, Morelos, su localización geográfica en el formato DMS es 18° 49' 28.8"N 99°05'46.7"W, a 1060.93 msnm, clima semicálido, temperatura media anual máxima de 38.0 °C y mínima de 18 °C, precipitación media en enero 47 mm, marzo 29 mm, mayo 75.5, agosto 87.5 mm, septiembre 86.5 y diciembre 42 mm según datos del Servicio Meteorológico Nacional (Servicio Meteorológico Nacional, 2016)

6.2 Colecta de material biológico

Los árboles de *P. campechiana* fueron sembrados en bolsas de polietileno negras calibre 14, con suelo nativo (16 kg) a los tres años de edad se pasaron a suelo, plantados en el campo experimental a cielo abierto del CEPROBI. Al año del trasplante se colectaron esquejes (punta de ramas terminal), estacas (semiduras y duras); el material seleccionado fue en buen estado sanitario y con vitalidad (Figura 3). Las muestras de 3 diferentes tejidos de propagación se colectaron con bisturí quirúrgico y tijeras de podar de una mano desinfectada con alcohol al 70%. Las muestras debidamente etiquetadas y envueltas en papel aluminio, se colocaron en una hielera para su transporte e inmediata congelación con nitrógeno líquido.

6.3 Extracción y evaluación de la concentración de catequina mediante HPLC

6.3.1 Verificación de la concentración de compuestos fenólicos en los tejidos de propagación

Se tomaron muestras de tejidos de propagación nivel (1, 2, 3), las cuales se utilizaron como pruebas para verificar la presencia y concentración de compuestos fenólicos a diferentes niveles, esquejes, estacas de madera suave y semidura. Este análisis se desarrolló en el laboratorio de proteínas del departamento de biotecnología del CEPROBI-IPN, las muestras fueron molidas (10 g) y fueron sometidas a extracción con metanol:agua (80:20); para la cuantificación de compuestos fenólicos totales, los extractos fueron filtrados con papel Whatmann #1, los extractos se mantuvieron en congelación a -4 °C. Para el barrido en el

espectrofotómetro (Shimadzu, UV-160) se utilizó una celda de cuarzo de 1 cm³, posteriormente se llevó a cabo la determinación de polifenoles totales mediante la técnica de Folin-Ciocateult.

Este método se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos producido por un reactivo del mismo nombre (Sigma, Aldrich). El reactivo de Folin-Ciocateult está constituido por una mezcla de ácido fosfowolfrámico (H₃PW₁₂O₄₀) y ácido fosfomolibdico (H₃PMo₁₂O₄₀), que se reduce por la oxidación de los fenoles existentes en las muestras, para producir óxidos de wolframio (W₈O₂₃) y de molibdeno (MoO₂₃). La coloración azul producida posee una absorción máxima en una longitud de onda de 750 nm, por lo que se deduce que dicha absorbancia será proporcional al porcentaje de compuestos fenólicos presente en la muestra. Debido a que el ácido gálico ha sido considerado como producto estándar en la determinación, los resultados obtenidos se presentaran como mg/ml de ácido gálico.

Para la determinación de la curva patrón se preparó una solución stock de ácido gálico (MARCA) en donde en un matraz aforado de 100 ml se disolvieron 0.5 g de ácido gálico en 10 ml de etanol y se aforó a 100 ml con agua, esta solución se mantuvo en refrigeración.

Para la preparación de la curva de calibración se agregaron 0, 1, 2, 3, 5, y 10 ml de la solución stock dentro de matraces aforados de 100 ml y se disolvió con agua desionizada, estas soluciones tuvieron las siguientes concentraciones respectivamente 0, 50, 100, 150, 250 y 500 mg/L ácido gálico. Los extractos fueron sometidos a esta determinación tomando una alícuota de 0.1 ml.

6.3.2 Selección del método de extracción y evaluación de la concentración de catequina en diferentes épocas del año mediante HPLC

Se llevó a cabo una comparación de la extracción de catequina usando la extracción asistida con ultrasonido (ANSON 2510) y la maceración. En los dos sistemas de extracción se trabajó con el mismo solvente metanol:agua (80:20) (Arts, 200), y a la misma temperatura (23°C). Se probaron tres diferentes tiempos de contacto solvente-material vegetal (15, 30, 45 min. para el ultrasonido y 1, 8, y 24 horas para la extracción), se llevó a cabo una concentración del extracto mediante un rotavapor Buchi-490; Buchi, Switzerland a una presión reducida de 210 mbar a 40 °C y 50 rpm. Posteriormente el extracto acuoso se llevó a liofilización. Los resultados se obtuvieron en mg de extracto seco. Después los extractos secos se analizaron mediante HPLC.

El análisis de la concentración se llevó a cabo mediante HPLC (Shimadzu LC-MS (Shimadzu, Tokio, Japón), se fue siguiendo el gradiente acidificado con ácido acético (2%) solvente A y metanol-agua, solvente B. La observación se realizó por medio de la absorbancia UV a una longitud de onda de 280 nm. La identificación de catequina fue realizada por la comparación de los tiempos de retención contra el estándar y su concentración se calculó por medio de una curva patrón.

La separación cromatográfica y de espectrometría de masas en los extractos metanólicos se llevaron a cabo en un sistema Shimadzu LC-MS (Shimadzu, Tokio, Japón), que consta de un controlador de sistema CBM-20A, dos bombas LC-20AD, un desgasificador DGU-20A3, un SIL-20, muestreador automático, un CTO 20A Columna Horno, un detector SPD-M20A UV-Vis de matriz de fotodiodos en masa, espectrómetro de interfaz LCMS-2020 (ESI) y un software de soluciones EMNV v 5.0. Las muestras se eluyeron y el análisis se realizó a 40 °C en una columna Alltima C18 HP HL (7 mm 9 53 mm, 3 lm; Alltech Associates Inc, Deerfield, IL, EE.UU.). El gradiente fue en un sistema: 1-3 min, 90% de A y 10% de B; 3 hasta 6 min, 80% de A y 20% de B; 6-10 min, 60% de A y 40% de B; 10-15 minutos, 50% de A y 50% de B; de 15-20 min, 40% de A y 60% de B; 20-23 min, 10% de A y 90% de B y 23 a 24 min 90% de A y 10% de B. El flujo fue de 1 mL / min y la inyección volumen fue de 20 mL. Para UV-VIS y 5 para espectrometría de masas

Se realizó una solución stock de catequina (1 mg/l) usando metanol:agua (1:1) como solvente. La solución fue diluida para dar diferentes concentraciones. Se leyó con el método antes mencionado para la cuantificación de catequina, la lectura se realizó por triplicado. También se obtuvo la ecuación $y = 1E^{07}x - 11877$, $r^2 = 0.9988$

La colecta de las muestras se programaron para los meses: enero, marzo, mayo, agosto, septiembre y diciembre, estos se eligen debido a que son meses de transición estacional. Cada fracción de material colectado se fraccionó en secciones de 5 cm de longitud, se envolvieron en papel aluminio para congelarlas en nitrógeno líquido para conservar los tejidos en su estructura anatómica y química, se almacenaron en un ultracongelador a -60 °C, hasta ser procesadas.

Posteriormente, para la obtención de extractos se llevó a cabo una molienda de los tejidos, se sonicaron (200W , 24kHz, 15 minutos, modelo ANSON 2510) con metanol como solvente para después ser filtradas, el filtrado se colocó en viales de plástico para conservarlos en ultracongelación. Después el extracto, se concentró en un rotavapor, hasta obtener el residuo

acuoso, este último se liofilizó (labconco, -45° C) y se conservó en refrigeración para que posteriormente fueran identificadas y cuantificadas las concentraciones de catequina por HPLC.

6.4 Evaluación de los depósitos de catequina mediante observación histológica

6.4.1 Selección del método de tinción con DMACA para la observación de catequina en cortes histológicos

Las muestras de los diferentes niveles (suaves, semidura y duras) fueron fraccionadas en segmentos de 1 x 0.5 cm, éstas se utilizaron para realizar los estudios histológicos para la localización de catequina en tejidos celulares. Las muestras fueron congeladas con nitrógeno líquido inmediatamente después de ser colectadas, posteriormente fueron fijadas en FAA (Formaldehído-ácido acético-alcohol-agua,) con un pH 7.2 durante 24 horas con el propósito de conservar la organización morfológica y del contenido químico.

La deshidratación de las fracciones se llevó a cabo mediante una secuencia de diferentes concentraciones crecientes de alcohol terbutílico (35, 50, 60, 70, 85, 95, 100, 100, 100, 100 %), la duración de cada paso en la secuencia fue de 24 horas.

La infiltración se llevó a cabo mediante concentraciones crecientes de xilol (25, 50, 100 %) (el xilol fue diluido en alcohol terbutílico), durante 12 horas en cada concentración, la inclusión se realizó con parafina fundida en estufa a 60 °C. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en moldes tipo casete para la obtención del bloque de parafina y así ser cortado en el micrótopo.

Los bloques de parafina fueron congelados a -60° C, posteriormente se realizaron cortes con el micrótopo (Leica RM 2389) de 12 micras de espesor, las secciones de corte fueron suspendidas en una solución de agua-glicerina a 30° C para después ser colocadas en portaobjetos de vidrio, se dejaron secar a temperatura ambiente (24°C) durante 48 horas.

Las pruebas de tinción se llevaron a cabo mediante dos procedimientos, el primero fue la tinción de safranina/verde rápido y el segundo con DMACA (4 dimetilaminocinnamaldehído) colorante que tiñe los depósitos de flavonoides en las células y localizar algún daño causado por este colorante (Sandoval, 2005)

El primer procedimiento (safranina/verde rápido) tuvo como objetivo usar la safranina, que presenta afinidad por las paredes lignificadas (paredes secundarias), y un segundo colorante, el verde rápido, que tiene afinidad por las paredes celulósicas (paredes primarias), para diferenciar la estructura celular y reconocer sus partes de manera estructural con buen contraste y compararlo con la tinción con DMACA. El método consistió en el lavado con etanol al 70% de los portaobjetos que contenían de 4 a 6 cortes continuos y posteriormente con etanol al 50%, 5 min de incubación en safranina, lavado con agua destilada, 1 min en etanol al 90%, incubación en verde rápido durante 1 min, lavado con etanol absoluto y por xileno. Después, fue montado en resina y la observación se realizó en microscopio fotónico (40x).

Posteriormente, se llevó a cabo una comparación de la tinción de catequina usando el colorante DMACA a diferentes tiempos de contacto entre la muestra y el colorante, comparando el método indirecto (desparafinación antes de teñir) y el método directo (sin desparafinar antes de teñir) (Sandoval, 2005). En los experimentos de tinción se trabajó con la misma temperatura (45°C). Se probaron tres diferentes tiempos de contacto DMACA-material vegetal (5, 10, 15 min. para ambos métodos), el criterio de selección para la mejor observación de los pozos de catequina fue cualitativa con inspección visual colocando + y – según la mejor observación.

La tinción de la catequina se realizó de acuerdo con el método de Gutmann y Feucht (1991): 0,1 g DMACA [4-dimetilaminocinamaldehído], 2.82 ml ácido sulfúrico 98% en 1-butanol hasta 100 ml. El procedimiento fue: las secciones obtenidas con el micrótopo se expanden en agua destilada y se montaron en portaobjetos. Después de secar durante 48 horas los portaobjetos se cubrieron con la solución de DMACA durante 10 min a 45°C; inmediatamente, los portaobjetos se enjuagaron con etanol al 95% y se secaron y después se montaron sobre resina. La observación se realizó en microscopio fotónico en aumento 40x.

6.4.2 Evaluación de los depósitos de catequina en diferentes épocas del año por análisis de imágenes

Las observaciones se llevaron a cabo con un microscopio NIKON® acoplado a una cámara SONY®. Con la catequina coloreada con DMACA en azul y las paredes celulares y citoplasma sin teñir, se realizaron mediciones de los descriptores de forma (área, perímetro, circularidad, diámetro de Feret). El análisis de la imagen fue procesada con el programa ImageJ de procesamiento de imagen digital de dominio público programado en Java desarrollado en el National Institutes of Health, E.U.A. Las imágenes fueron analizadas desde el canal rojo que permite la mejor resolución para el color azul y después la conversión en escala de grises, pasando por los siguientes procesamientos: *Brightness/Contrast*, *color balance*, *sharpen*, *threshold*, *find edges* y *noise*, para obtener la mejor nitidez de los pozos de catequina, para poder realizar las mediciones de los descriptores de forma (área, perímetro, circularidad, diámetro de Feret). Estas últimas se realizaron de forma manual utilizando las herramientas de selección del programa ImageJ y con un conteo de 30 zonas de acumulación de catequina por micrografía.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Verificación de la concentración de compuestos fenólicos en los órganos de propagación

Los compuestos fenólicos totales en los extractos de los diferentes tejidos de propagación oscilaron entre 629 y 449 mg GAE g⁻¹ FW (miligramos de equivalente de ácido gálico/gramo de extracto fresco, por sus siglas en ingles), el tipo de tejido de propagación tuvo un efecto significativo en el contenido total de compuestos fenólicos, que dependía del nivel del que fue muestreado (esquejes, estacas de madera semidura, estacas de madera dura) (Cuadro 2).

El nivel 3 que corresponde a los esquejes, fue el órgano con el más alto contenido fenólico, mientras que los tejidos provenientes de estacas duras fueron la menor fuente de flavonoides. Estos compuestos fueron significativamente más abundantes en tejidos más jóvenes (esquejes, y estacas de madera semidura). Sin embargo no se encontró diferencia significativa entre los dos diferentes órganos de estaca dura (Cuadro 2). Con estos resultados constatamos que el contenido de flavonoides es diferente en cada tejido de propagación y que para fines experimentales se tomara la estaca de madera dura como un solo tejido de propagación.

La identificación de la concentración de los flavonoides en diferentes tejidos de propagación, fue útil para el establecimiento y optimización del protocolo experimental a lo largo de los meses de transición estacional.

Cuadro 2. Contenido de polifenoles totales mediante la técnica de Folin-ciocateult en tres diferentes tejidos de propagación (esqueje, estaca de madera semidura y estaca de madera dura)

	Esqueje	Estaca semidura	Madera dura	
			Estaca de rama	Estaca de tallo
Contenido de fenoles totales (mg GAE g⁻¹ FW)	629.20	568.20	449.20	475.80
Test: Tukey	C	B	A	A

Los valores son medias de los resultados realizados por quintuplicado (n=5)
Dentro de cada variable, diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los tejidos de propagación (material colectado en enero 2015)

7.2 Selección del método de extracción de catequina

Para la extracción de catequina se compararon: la extracción asistida con ultrasonido y la maceración. El rendimiento de la extracción se mejoró conforme aumentó el tiempo de duración del contacto entre el solvente y el material vegetal. Los rendimientos máximos en los dos tipos de extracción se lograron a los mayores tiempos de contacto en ambos casos, pero no se observó diferencia significativa entre los tiempos de 15 y 30 minutos en sonicación, contrario a la maceración en donde en todos los tiempos se observó una diferencia en el rendimiento en la extracción (Cuadro 3).

La eficacia de ambos tipos de extracción se determinó por medio de un análisis mediante HPLC, en donde se observó que la extracción asistida con ultrasonido logró una mayor concentración de catequina en menor tiempo, y es significativamente diferente a la cuantificación lograda por maceración.

Cuadro 3. Comparación de dos métodos de extracción para la obtención de catequina

Tipo de extracción	Tiempo	Peso en base fresca (g)	Peso en base seca (g)	Extracto obtenido (mg)	Rendimiento (%)	Extracción de catequina (mg*g-1)
Maceración	1 h	15.77	1.12	39.7	3.54 A a	
	12 h	15.25	1.40	72.1	5.15 B b	
	24 h	15.43	1.55	168.7	10.88 C c	0.042 A
Sonicación	15 min	15.88	1.50	112.5	7.50 A d	0.055 B
	30 min	15.34	1.57	113.8	7.34 A d	
	60 min	15.16	1.46	118.2	8.09 B e	

Los valores son medias de los resultados realizados por triplicado (n=3)

Dentro de cada tipo de extracción, diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los tiempos de extracción, y diferentes letras minúsculas indican diferencias en los rendimientos entre los dos tipos de extracción, así mismo, en la cuantificación de catequina letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre los dos tipos de extracción.

Cada técnica tiene sus propias ventajas y desventajas, pero el objetivo principal del método elegido fue el logro de la extracción completa de los compuestos de interés y sin modificación química, que se comprobó al encontrar la molécula de interés dentro de los extractos. La eficiencia de extracción depende de varios factores como el tipo y la concentración de la proporción de disolvente, tiempo de extracción sólido-disolvente, temperatura, pH, principalmente. Sin embargo, en la mayoría de los estudios se explica solo la influencia de un solo factor (Toma, 2001; Naczk, 2004; Lapornik, 2005) mientras que las interacciones entre los diferentes factores no se han examinado a fondo. La utilización del ultrasonido ha demostrado ser un método más simple, más rápido y más eficaz que la maceración convencional para extraer la catequina a partir del material de propagación.

Estudios anteriores (Bonilla, 1999; Robbins, 2003; 2004; Louli, 2004; Negro *et al.*) han informado sobre la extracción de flavonoides de diferente material vegetal, pero la literatura es escasa cuando se trata sobre tejidos de propagación y su contenido de flavonoides.

7.3 Evaluación de la concentración de catequina en diferentes épocas del año mediante HPLC

Por otra parte se encontraron concentraciones de catequina en todas las muestras colectadas durante los meses de transición estacional, observando que en los meses de mayo, agosto y septiembre las concentraciones de esta molécula son mayores siendo agosto el mes con más presencia con una concentración de 4.1 µg de catequina/mg de PS, en el nivel 2 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Concentración de catequina en mg ES/ml cuantificada por HPLC, en diferentes épocas del año y diferente tejido de propagación de *Pouteria campechiana*

Tejido de propagación	Enero	Marzo	Mayo	Agosto	Septiembre	Diciembre
Nivel 1	0.0009 ^{A a}	0.0009 ^{A a}	0.0012 ^{B a}	0.0017 ^{C a}	0.0017 ^{C a}	0.0011 ^{AB a}
Nivel 2	0.0006 ^{A a}	0.0007 ^{A a}	0.0022 ^{C b}	0.0041 ^{D c}	0.0025 ^{C ab}	0.0013 ^{B ab}
Nivel 3	0.0007 ^{A a}	0.0010 ^{A a}	0.0024 ^{B b}	0.0027 ^{CD b}	0.0031 ^{BC b}	0.0017 ^{D b}

Los valores son medias de los resultados realizados por triplicado (n=3)
Dentro de cada nivel, diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los meses de colecta de tejidos de propagación y diferentes letras minúsculas indican diferencias en los tres niveles

Estudios realizados por Haile *et al.*, (2011) con *Boswellia papyfera*, un árbol multipropósito, informa que el mejor rendimiento de supervivencia usando propagación vegetativa con estacas de madera semidura, se obtuvo cuando el material fue colectado en el mes de marzo, y el desempeño más débil fue en el mes de mayo. Estos resultados se asemejan a los encontrados con zapote amarillo, en donde el nivel de catequina sube en el mes de mayo y disminuye en el mes de marzo. Otro experimento realizado por Abiyu (2016) indica que la época de recolección y la longitud de corte en las estacas muestran diferencias significativas. Este autor observó que el material recogido en el mes de octubre presentó un desempeño débil en la propagación. Con respecto al presente estudio, de igual manera, los resultados obtenidos con tejidos de propagación de *Pouteria campechiana*, indicaron que el mes de agosto y septiembre presentan la mayor concentración de catequina, y por consiguiente, serán los meses en donde el porcentaje de supervivencia de las estacas será menor (Figura 4).

Otro estudio realizado con chicozapote (González, 1999), determinó que en el mes de mayo, es la mejor época para realizar técnicas de propagación con estacas de madera semisuave con la técnica de injertos. Por otro lado, una investigación con chirimoyo (Castro, 1999) concluyeron que el mes de agosto es mala época para realizar la propagación, estos resultados son cercanos a los encontrados con zapote amarillo.

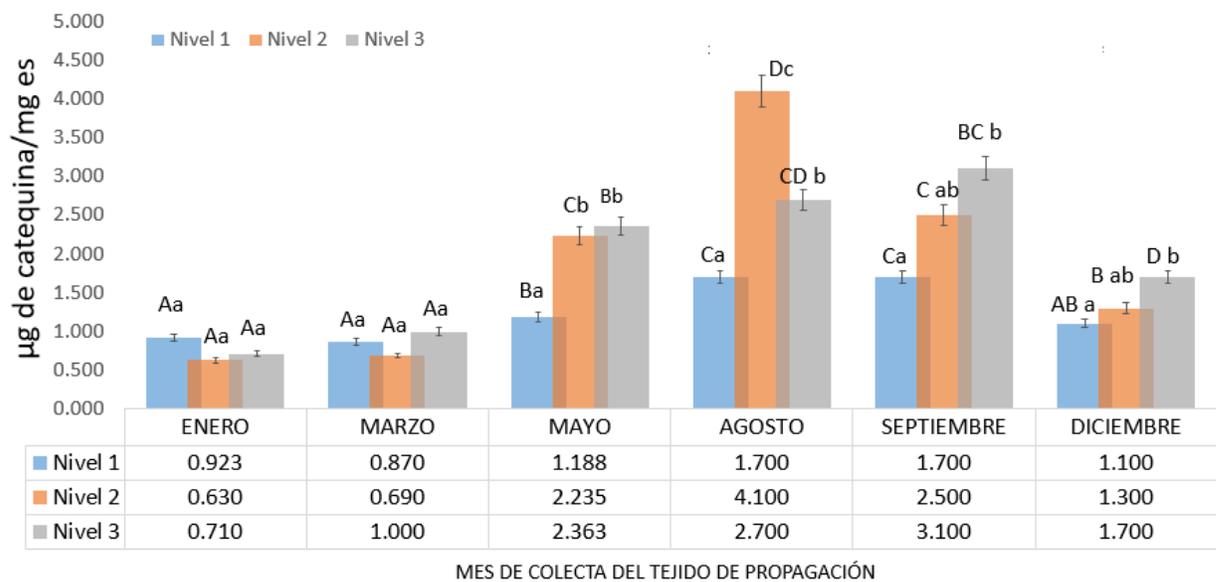


Figura 4. Concentración de catequina en diferentes meses de colecta de material de propagación de *Pouteria campechiana*

Los valores son medias de los resultados realizados por triplicado (n=3)

Dentro de cada nivel, diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los meses de colecta de tejidos de propagación y diferentes letras minúsculas indican diferencias en los tres niveles de cada mes de colecta.

En el mes de enero hubo frutos en desarrollo, en marzo los frutos presentaron completo desarrollo y en el mes de mayo los frutos fueron cosechados. En agosto y septiembre los árboles volvieron a formar yemas florales; con relación a la época de lluvias agosto y septiembre son los meses de mayor precipitación, (Figura 5). Posiblemente el árbol se encuentra expuesto a mayor ataque tanto de hongos en el follaje como de insectos y tal vez por estas razones (fenológica y por alta humedad ambiental) es que aumenta el contenido de flavonoides, además la catequina es uno de las fenoles reportados como antimicrobiano y repelente (Metraux y Raskin, 1993).

En lo relacionado a la propagación, enero y marzo podrían ser los meses adecuados para la colecta del material vegetativo; en particular el nivel 2 (estacas semiduras), aunque estadísticamente no hay diferencia significativa entre los diferentes tejidos. Posiblemente la temperatura no tuvo influencia en los niveles de catequina, ya que en el área de colecta, los niveles de mayor temperatura fueron marzo abril y mayo,

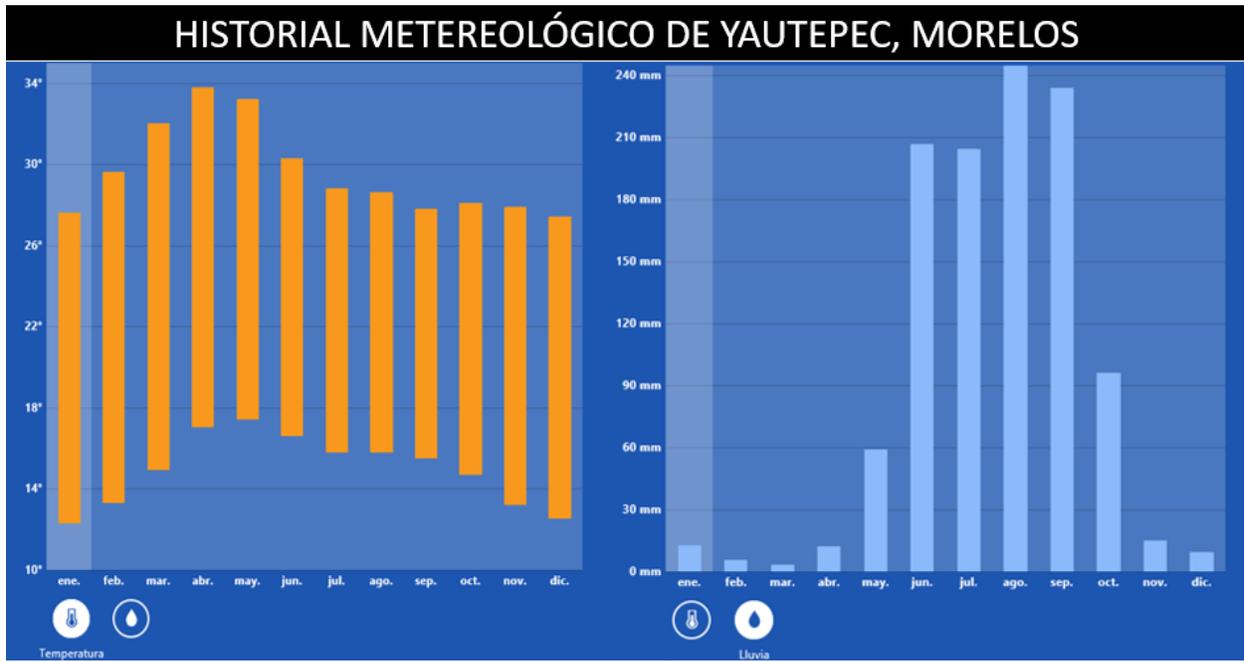


Figura 5. Historial meteorológico de Yauhtepec, Morelos del año 2015-2016

7.4 Selección del método de tinción con DMACA para la observación de catequina en cortes histológico

El uso de la tinción con safranina/verde rápido, permitió comprobar la calidad de la tinción con DMACA (Figura 4) y permitió minimizar el riesgo de una interpretación errónea, la selección del método de tinción permitió obtener las condiciones óptimas de tinción (Cuadro 4), en donde se pudo observar una mejor calidad de tinción con el método directo, y a un tiempo de 15 min de contacto entre el colorante y el tejido vegetal. Las observaciones de los depósitos de catequina en una coloración azul son semejantes a las observaciones realizadas por otros investigadores como se puede ver en la Figura 5, (Cadot, 2006, Feucht, 2007)

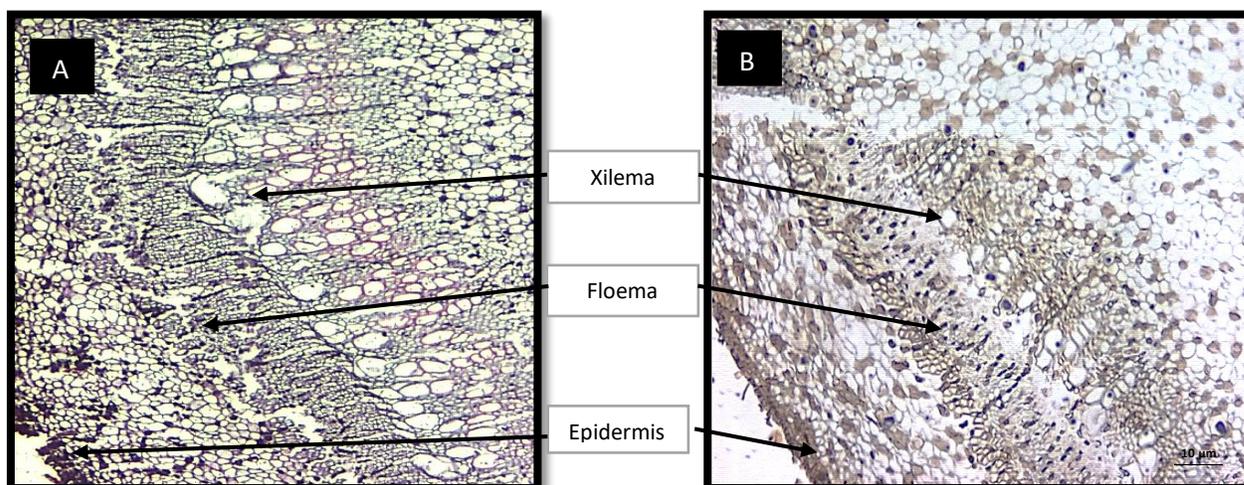


Figura 6. Micrografías de tejido de propagación de zapote amarillo A: Tinción con safranina/verde rápido, B: Tinción con DMACA, las micrografías corresponden a estaca semidura

La especificidad del reactivo DMACA con los flavonoides es reconocida por su sensibilidad, en particular con los flavon-3-oles. La respuesta con un flavonoide que contiene un grupo carbonilo es débil, en general con un aceptor de electrones en su grupo funcional, tal es el caso de los flavonoles, es débil o nula, por lo tanto, si hay interferencias serían mínimas. El uso de ácido sulfúrico que mejora la sensibilidad de la respuesta al DMACA por parte del tejido, podría dar lugar a una difusión o lixiviación de los flavonoides, debido a su acción corrosiva en algunos tejidos vegetales. Feucht (2009) no encontró ningún daño visible incluso en el tratamiento a largo plazo de las vacuolas con el reactivo, del mismo modo en la figura 7 se observa una comparación de las tinciones a diferentes tiempos de contacto.

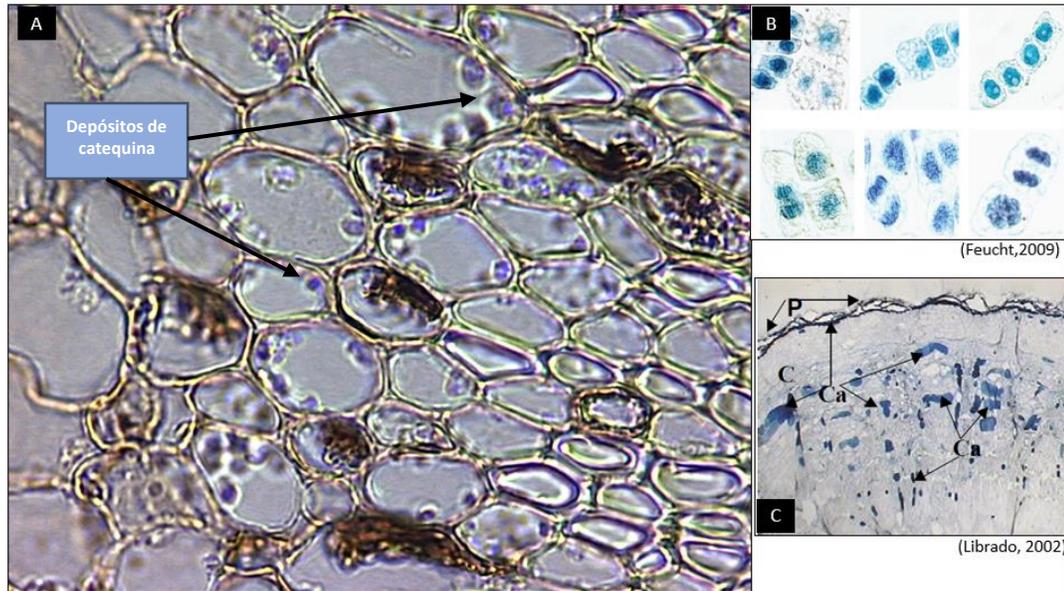


Figura 7. Micrografías con la tinción con DMACA, A: Corte histológico de *Pouteria campechiana* (esta investigación), B: Corte de *Taxus baccata*, C: Corte de *Annona muricata*

Por lo tanto, los resultados mostrados en la cuadro 4, permitió obtener las condiciones óptimas de tinción para los cortes de los tejidos de propagación provenientes de cada mes de colecta. El tiempo de 15 minutos fue el tiempo óptimo para realizar el procesamiento de las muestras provenientes de los meses de colecta los depósitos se observaron con mayor nitidez (Figura 6). Feucht (2007) en un estudio de tinción de cortes histológicos de centeno reportó que su procesamiento de muestras fue del mismo modo de 15 minutos, un tiempo más corto en la experimentación dio como resultado una tinción mínima de los depósitos de catequina Figura 7.

Cuadro 5. Comparación de dos métodos para la tinción con DMACA *P. campechiana* estaca de madera semidura

Método DMACA	Indirecto			Directo		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
Tiempo de contacto	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
Temperatura	45 °C	45 °C	45 °C	45 °C	45 °C	45 °C
Observación de catequina	-	+	+	+	++	+++

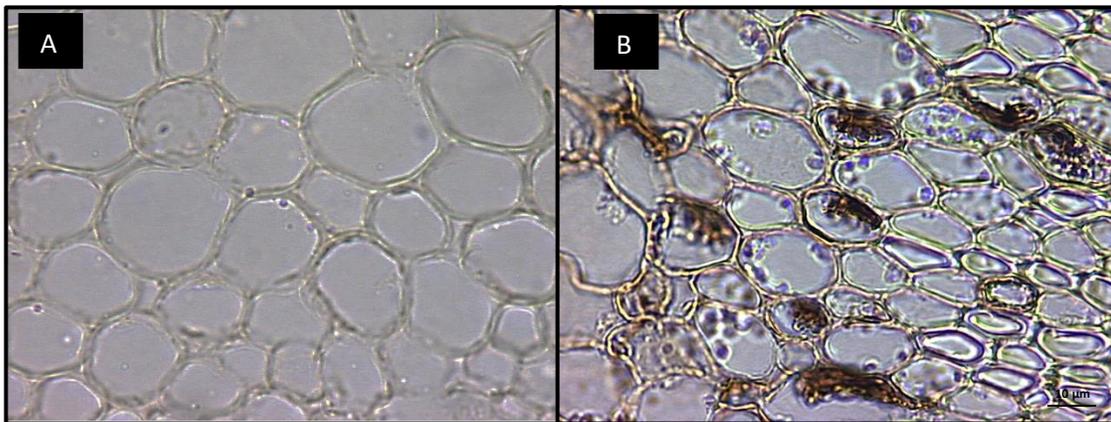


Figura 8. Micrografías con la tinción con DMACA, A: Método indirecto, B: Método directo.

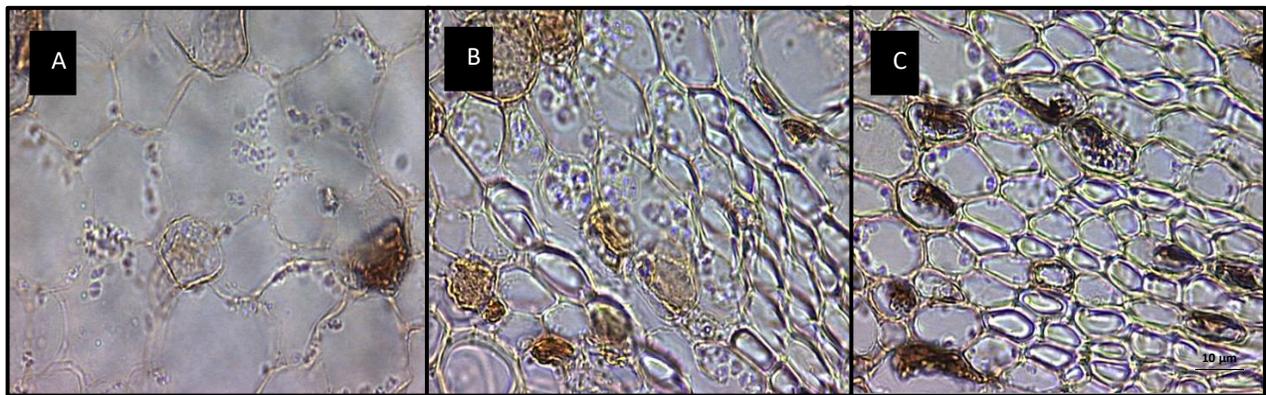


Figura 9. Micrografías a diferentes tiempos de contacto ente el colorante DMACA y el tejido de *Pouteria campechiana*

7.5 Evaluación de los depósitos de catequina mediante análisis de imágenes

La evaluación de los depósitos de catequina en los diferentes meses de colecta mostró, que las mayores áreas se encuentran en los meses de agosto y septiembre en todos los órganos de propagación, pero en las estacas semiduras se encontró la mayor área de depósitos de catequina. Por otro lado, un valor de 1.0 indica que es un círculo perfecto, y conforme el valor se acerca a 0.0 nos indica un incremento en la elongación; de esta manera se puede ver en la cuadro 5, que se obtuvieron valores desde 0.21 a 0.95; siendo los valores más altos los encontrados en los depósitos del nivel 1, seguido del nivel 3 y por último el nivel 2. en todos los meses de colecta se encuentran en células cercanas al xilema y el floema y los depósitos se alargan en el área circundante a la pared celular (coloración lila-morado). Los valores más altos con respecto al mes de colecta fueron en los meses de diciembre y enero.

La intensidad media de la pigmentación indica el porcentaje que ocupan los depósitos de catequina dentro de la célula, estos valores van desde 44.46 hasta el 1.11 % del área de la célula (Cuadro 5 y Figura 8).

Cuadro 6. Mediciones de las células con depósitos de catequina en cortes histológicos de tejidos de propagación de *P. campechiana* con el software ImageJ

Mes de colecta	Tejido de propagación	Área μm^2	Circularidad	Perímetro	Diámetro de Feret	Intensidad media de la pigmentación
Enero	Nivel 1	3.9	0.91	1.03	0.348	1.50
	Nivel 2	27.22	0.33	7.21	2.426	10.49
	Nivel 3	10.35	0.72	2.74	0.923	3.99
Marzo	Nivel 1	1.55	0.94	0.41	0.138	0.60
	Nivel 2	5.63	0.43	1.49	0.502	2.17
	Nivel 3	3.57	0.56	0.95	0.318	1.38
Mayo	Nivel 1	9.42	0.89	2.49	0.840	3.63
	Nivel 2	31.56	0.21	8.36	2.813	12.16
	Nivel 3	15.88	0.62	4.21	1.416	6.12
Agosto	Nivel 1	5.85	0.73	1.55	0.521	2.25
	Nivel 2	115.36	0.41	30.55	10.283	44.46
	Nivel 3	39	0.58	10.33	3.476	15.03
Septiembre	Nivel 1	7.81	0.77	2.07	0.696	3.01
	Nivel 2	98.74	0.38	26.15	8.802	38.06
	Nivel 3	31.49	0.45	8.34	2.807	12.14
Diciembre	Nivel 1	2.87	0.95	0.76	0.256	1.11
	Nivel 2	26.32	0.51	6.97	2.346	10.14
	Nivel 3	9.26	0.68	2.45	0.825	3.57

Barras azules muestran la proporción de la magnitud en los valores

7.6 Estimación del periodo adecuado para la propagación de acuerdo a la menor concentración de catequina.

Para mejorar el enfoque analítico, se propuso el uso complementario de la técnica histológica de tinción con DMACA, ésta técnica permitió la espacialización de los flavon-3-oles en el tejido celular (Chevalier, 2003; Cadot, 2006; Feucht, 2007). La técnica bioquímica e histológica proporciona un enfoque que permite la asociación de factores cuantitativos y datos espaciales.

Los resultados de la detección bioquímica de la catequina y la identificación histológica se relacionan cercanamente, y nos permitieron comprender mejor la evolución del contenido de catequina, en lugar de uno y otro método por separado. En este estudio se mostró que ambas técnicas son complementarias y equivalentes

El tiempo de colecta del material de propagación es un factor importante para asegurar el éxito en la propagación, el mejor período de colecta con respecto a la menor concentración de catequina fue en enero y ocupando tejido de propagación de madera semisuave, seguido de mayo con las mismas características, y en agosto y septiembre, la época con las características menos deseables para realizar la propagación por estacas de zapote amarillo.

8. CONCLUSIONES

La presencia de catequina fue variable en las diferentes épocas del año en los tejidos de propagación de zapote amarillo (*Pouteria campechiana*), por lo que fue posible estimar la época en que la concentración de catequina fue menor, y así poder prescribir un período de tiempo adecuado para coleccionar el material de propagación.

Con la valoración bioquímica e histológica de la presencia de catequina en tejidos de propagación de zapote amarillo durante diferentes épocas del año se obtuvo información científica para estimar el período más adecuado para coleccionar el material de propagación, además de considerar la humedad ambiental

Todos los tejidos de propagación: estacas de madera suave, semidura y dura, presentaron catequina; y el método de extracción de catequina más eficiente fue el de sonicación, con el menor tiempo de proceso.

El método de tinción con DMACA para la observación de los depósitos en cortes histológicos fue el método directo, y la mayor presencia de catequina en los depósitos se observaron en los meses de mayor precipitación en tejido de estaca semidura.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Agostini, T., Abreu, L., Rossetti, A. 2003. Efeito do congelamento e do tempo de estocagem da polpa de acerola sobre o teor de carotenoides. *Revista Brasileira de Fruticultura* 25(1): 56-58
- Agostini, T., Wondracek, D., Lopes, R., Fontes, R., Ferreira, F. 2010. Composição de carotenoides em canistel (*Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni). *Revista Brasileira de Fruticultura* 32(3): 903-906
- Aguilar, J.I. (1966) Relación de unos aspectos de la flora útil de Guatemala. Tipografía Nacional, Guatemala. 383 p.
- Aguilar, J.M. y Aguilar, J.A. (1992) Arboles de la biosfera Maya Petén. Centro de Estudios Conservacionistas (CECON), Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC, Guatemala. 272 p.
- Alves, R., Brito, E., Rufino, M., Sampaio, C. 2008. Antioxidant activity measurement in tropical fruits: A case study with acerola. *Acta Horticulturae*, 773: 299–305
- Arts, I., Van de Putte B., Hollman, P. 2000. Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in The Netherlands, Tea, Wine, Fruit Juices, and Chocolate Milk *J. Agric. Food Chem.* 48(5):1752-1457.
- Azurdia, C. (2004) Compilador. Frutales Sapotáceos Centro Americanos. Proyecto Diversidad, Conservación, Cooperación y Uso Sostenible de los Recursos Genéticos de Frutales Tropicales Nativos de América Tropical. Parte 1. Sapotáceas. IPGRI, en prensa.
- Balerdi C., Shaw P. 1998. Sapodilla, sapote and related fruit. In: *Tropical and subtropical fruits*. AgScience, Inc., Auburndale, FL, pp: 8–136
- Barreto, M., González, G. 1995. Determinación de la Altura Óptima de injertado en plántulas de chicozapote (*Achras sapota* L.) en Tecomán, Colima. Tesis. Universidad de Colima 28 p
- Beckman, C. 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants?. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57(3):101-110
- Beltrán, L. 1997. En: *La Alelopatía: Ciencia o fenómeno*. Cultivos tropicales. 18(3): 47-58
- Booy, G. 1995. Identification of *Gerbera* cultivars based on differences in phenolic compounds in ray florets. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 70 (1): 135-146
- Borys, M., 2001. El Potencial Frutícola de la República Mexicana. Fundación Salvador Sánchez Colín, CICTAMEX. Toluca, México. 99 p
- Camtwell, T. 1979. The fruits of the genus *Annona*. *International Journal of Agricultural Sciences* 298: 26
- Cardoso, L., Martino, H., Moreita, A., Ribeiro, S., Santana, H. 2011. Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. *Food Research International*, 44: 2151–2154
- Carranza, E. 2005. Sapotaceae. Instituto de Ecología. Centro Regional del Bajío. Fascículo 132
- Castro, M., Cautin, M., Biancani, L. 1999. Evaluation of three disinfection protocols and three protocols for the use of antioxidants in vitro cultivation of cherimoya *Annona cherimola* Mill, and the quantitative determination of phenolic contents in branches. *Acta Horticulturae* 497: 303-307.

- Coronel, R. (2002) Underexploited nuts and fruits of the Philippines. University of Philippines. 10p
- Costa, D., Wondracek, D., Lopes, R., Vieira, R., Ferreira, R. 2010. Carotenoids composition of canistel (*Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni). *Rev. Bras. Frutic.* 32(3):903-906
- Crane, J.H. (1993) Commercialization of carambola, atemoya, and other tropical fruits in south Florida. pp. 448-460. In: J. Janick and J.E. Simon (eds.), *New crops*. Wiley, New York.
- Decooman, L., Everaert, P., Dolci, M. 1996. The possible role of phenolics in incompatibility expression in *Eucalytus gunnii* micrografts. *Phytochemical Analysis* 7: 92-96.
- DICTA. (1997) Informe técnico final, Honduras. In: IPGRI (ed.) *Diversidad, conservación y uso sostenible de los recursos genéticos de frutales nativos de América tropical* Cooperación técnica IPGRI-BID No. ATN/SF-4356-RG. Cali, Colombia. 30 p
- Domínguez, B., Martínez, A., Alia, I. 2010. Caracterización de la maduración en ecotipos de zapote mamey. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 11: 122-129
- Errea, P. 1992. Scion-rootstocks effects on the content of flavan-3-ols in the union of heterografts consisting of apricots and diverse *Prunus* rootstocks. *International Society for Horticultural Science* 57 (3): 134-138
- Errea, P. 1998. Implications of phenolic compounds in graft incompatibility in fruit tree species. *Scientia Horticulturae* 74: 195-205
- Errea, P. 2001. Early detection of graft incompatibility in apricot *Prunus armeniaca* using in vitro techniques. *Physiologia Plantarum* 112: 153-141
- Errea, P., Felipe, A. 1994. Graft establishment between compatible and incompatible *Prunus* sp. *Journal of Experimental Botany* 45 (272): 393-401.
- Esquivel, M. and Hammer, K. (1992) Native food plants and the american influence in cuban agriculture. In: Esquivel, M; H. Knupffer and K. Hammer (eds.) *Origin, evolution and diversity of Cuban plant genetic resources*. Institut fur Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, Germany. Vol 1: 46-74
- Feucht, W., Schmid, P. 1988. Incompatibility of grafted cherry trees (*P. avium/P. cerasus*): Loss of metabolic tolerance as a consequence of environmental stress. *Acta Hort.* 227: 87-89
- Feucht, W., Treutter, D. 1991. Phenol gradients in opposing cells of *Prunus* heterografts. *Advances in Horticultural Science* 5: 107-111.
- Feucht, W., Treutter, D. 1990. Flavan-3-ols in trichomes, pistils and phelloderm of some tree species. *Annals of Botany* 65: 225-230.
- Feucht, W., Treutter, D., Christ, E. 1992. Localization and quantitative determination of catechines and proanthocyanidins in the phloem of elm and cherry. *Tree Physiology* 10: 169-177.
- Food and Agriculture Organization (FAO)- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2013) Trade. Tomado de <http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx>. el día 15 de noviembre del 2016
- Gebhardt, K. 1982. Polyphenol changes at the union of *Prunus avium/Prunus cerasus* grafts. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology.* 57: 253-258.
- González, G. Ruíz, B. 1999. Respuesta del chicozapote *Achras sapota* L. a cinco tipos de injerto y tres épocas de injertado. *Horticultura Mexicana*. VIII Congreso de Horticultura. Manzanillo, Col. México. 7(1): 25

- Gutmann, M., Feucht, W. 1991. A new method for selective localization of catechins and procyanidins. *Acta Horticulturae*. 381: 797-801
- Guyot, S. Marnet, N. 1998. Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety *Malus domestica* var. Kermerrien. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (5): 1698-1705
- Harborne, J., 1982. Introduction to Ecological Biochemistry, second ed., Academic Press, New York, NY.
- Hartmann T. H., y Kester, E. D. 1992. Propagación de plantas. Principios y prácticas. Ed. CECSA. Sexta reimpression. pp. 365-466. México.
- Hudson, T. 2002. Propagación de vegetales: Principios y prácticas, enlace virtual . 2014, FAO Recuperado desde: <http://www.fao.org/forestry/4939/es>.
- Hutchinson, A. 1990. Plant propagation and cultivation. The Avi Publishing Company. Inc. 195-197. Westport Conn USA.
- ICUC - INTERNATIONAL CENTRE FOR UNDERUTILISED CROPS. 2004. Pouteria fruits for the future. Fact sheet, Southampton, n.11, p. 1-3,
- INEGI-Colegio de Postgraduados. 1991. Análisis de la situación frutícola en México. VII Censo agropecuario, 3-15.
- International Tropical Fruits Network (TFNet). (2003) www.itfnet.org
- IPGRI. (1997) Diversidad, conservación y uso sostenible de los recursos genéticos de frutales nativos de América tropical. Informe final. Cooperación técnica IPGRI-BID No. ATN/SF-4356-RG. Cali, Colombia
- Jonard, R. 1990. Early testing of graft incompatibilities in apricot and lemon trees using in vitro techniques. *Scientia Horticulturae* 43: 117-128.
- Jung, M. L. 1994. Cultivation of grafted vegetables I. Current status, grafting methods, and benefits. *HortScience*, 29 (4), 235-244
- Kenji, K. 1994. Cultivation of grafted vegetables II. Development of grafting robots in Japan. *HortScience* 29 (4): 240-244
- Kong, K., Khoo, H., Prasad, N., Chew, L., Amin, I. 2013. Total phenolics and antioxidant activities of Pouteria campechiana fruit parts. *Sains Malaysiana*, Bangi, 42(2):123-127
- León, J. (2000) Botánica de los cultivos tropicales. 3ª. Ed. IICA, San José, Costa Rica. 522 p
- Lin, J., Lin, C., Liang, Y. 1998. Survey of catechins, gallic acid and methylxantines in green, oolong puer and black teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (9): 3635-3642
- Ma, J., Yang H., Basile, M., Kennelly, E. 2004. Analysis of polyphenolic antioxidants from the fruits of three Pouteria species by selected ion monitoring liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:5873-5878
- Martín, F. and Malo, S. (1978) Cultivation of neglected tropical fruits with promise. Part 5. The canistel and its relatives. U.S. Department of Agriculture Science and Education Administration. 12p
- Marx, F., Fabricius, H. 1997. Analysis of guarana. SPE-HPLC determination of guarana and guarana extracts in food stuffs. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 93 (6): 171-174.
- McLellan A., Pratt D., Kaltz O., Schmid B. 1997. Structure and analysis of phenotypic and genetic variation in clonal plants. In: de Kroon H, van Groenendael J, editor. The

- Ecology and Evolution of Clonal Plants. The Netherlands: Backhuys Publishers. pp. 185–210
- McMillan, B. P. 1979. Plant propagation. Ed. Mitchel Beazley Publishers Limited. pp. 86-87. Nueva York.
- Métraux, J., Raskin, I. 1993. Role of phenolics in plants disease resistance. En: Biotechnology in plants disease control I. Ed. Wiley- Liss. USA. pp. 191-209
- Modesto, P. 2013. El canistel. Departamento de Fruticultura Tropical. Instituto Canario de Investigaciones Agrícolas. Gobierno de Canarias. España. Folleto informativo
- Morton, J. (1987) Canistel. In: J.F. Morton (ed.) Fruits of Warm Climates. Miami, Fl. 402-405.
- Morton, J. 1987. Canistel. In: Fruits of warm climates. Julia F. Morton, Miami, FL p. 402–405. Recuperado desde: <https://hort.purdue.edu/newcrop/morton/canistel.html> el día 29 de agosto del 2013
- Musachhi, S. 1997. A new in vitro methodology for studying cell-cell recognition in pear-quince graft incompatibility. *Acta Horticulturae* 451: 731-740
- Nascimento, V., Martins, A., Hojo, R. Caracterización física y química de los frutos del mamey. 2008. *Revista Brasileira Fruticultura, Jaboticabal*, 30(4):953-957
- National Plant Database. 2005. Tomado de http://ntbg.org/plants/plant_details.php?plantid=9427 el 09 de septiembre del 2015
- Nicholson R. 1992. Hammerschmidt R., Phenolic Compounds and Their Role in Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 30:369-389.
- Nissen, R. 1987. Propagation of *Annona* species: A review. *Scientia Horticulturae* 33: 75-85
- Núñez, C. 2004. Construcción de dendogramas de taxonomía numérica mediante el coeficiente de distancia X2 : una revisión. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 10 (2): 229-237
- Patiño, V.M. (1963) Plantas cultivadas y animales domésticos en América equinoccial. 1ª. ed. tomo 1, frutales. Cali, Imp. Departamental. pp. 382-395
- Pennington, T.D. (1990) Sapotaceae. Monograph 52. Flora Neotropica. The New York Botanical Garden. New York.
- Pennington, T.D. y Sarukhan, J. (1968) Árboles tropicales de México. United Nations, FAO. 413 p.
- Ponce, J. 1979. Comportamiento de *Annona reticulata* L. sobre varios patrones. Proceedings of the tropical Region. *American Society of Horticultura Science* 23: 119-121
- Pridham, J. 1960. Phenolics in Plants in Health and Disease, Pergamon Press, New York, NY.
- Ricker, M. y Daly, D. (1998) Botánica económica en bosques tropicales. Principios y métodos para su estudio y aprovechamiento. Ed. Diana, México. 293 p
- Ricker, M., Mendelsohn, R.O., Daly, C.C. y Angeles, G. (1999) Enriching the rainforest with native fruits trees: an ecological and economic analysis in Los Tuxtlas (Veracruz, Mexico). *Ecological Economics* 31:439-448.
- Ricker, R., Siebe, C., Sanchez, S., Shimada, K., Larson, B., Martinez, M. and Montagnini, F. (2000) Optimising seedling management: *Pouteria sapota*, *Diospyros digyna*, and *Cedrela odorata* in a Mexican rainforest. *Forest Ecology and Management* 139: 63-77

- Saijo, R., Takeda, Y. 1999. HPLC analysis catechins in various kinds of green teas production in Japan and abroad. *Japanese Society for Food Science and Technology* 46 (3): 138-147
- Salvatierra, G. 1999. Histochemical observation and HPLC análisis of phenolic compounds at the union of dwarf peach trees grafted on *Prunus tomentosa*. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 67 (4): 475-482
- Sandoval, E. 2005. Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Cuadernos del Instituto de Biología 38. Instituto de Biología, UNAM.. Primera edición. pp. 54-56
- Santamour, Jr. F. 1992. Predicting graft compatibility in Woody plants. Combined Proceedings. *International Plant Propagators Society* 42: 131-134
- Sauls, J. and Campbell, C.W. (1994) The canistel. Florida Cooperative Extension Service. University of Florida. Fact Sheet HS-61. 2 p.
- Sauri, E. (2001) Frutas exóticas de la península de Yucatán. Instituto Tecnológico de Mérida. Mérida, Impresos Puerto. 109 p
- Schmid, P., Feucht, W. 1980. Gewebespezifische oxidative Un setzung von polyphenolen durch peroxidase in kirsctrieben. *Gartenbauwissenschaft*. 45: 68-73
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta (SIACON). 2013. Sistema de información agroalimentaria de consulta de producción frutícola. México, CDMX Tomado de <http://www.siap.gob.mx> el día 15 de noviembre del 2016
- Shanfa, L., Yanru, S. 1999. Relation between phytohormone level and vascular bridge differentiation un graft union of explanted internode autografting. *Chinese Science Bulletin* 44 (20): 1874-1879.
- SMN, Servicio Meteorológico Nacional. Recuperado de <http://smn.cna.gob.mx/es/informacion-climatologica-ver-estado?estado=mor> el dia 16 de agosto del 2016
- Standley, P. and Williams, L. (1967) Flora of Guatemala. *Fieldiana Botany*. 24, part VIII (3): 211-244.
- Suárez, V., Santamaría, V.1994. Hight performance liquid chromatography of the neutral phenolic compouns of low molecular weight in apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42: 2732-2736.
- Tissut, M. 1980. Effet de differents polyphenols sur les mitochondries et les chloroplastes isoles. *Phytochemistry* 19: 495-500
- Treuter, D., Santos, B. 1994. Identification of flavan-3-ols and procyanidins by high performance liquid chromatography and chemical reaction detection. *Journal of Chromatography* 667: 290-297
- Treutter, D. and Feucht, W. 1991. Accumulation of phenolic compouns above the graft union cherry trees. *International Society for Horticultural Science* 56: 134-137
- Treutter, D., Feucht, W. 1986. Taxonomically relevant flavonoid glycoside of *Prunus* phloem and their response according to various physiological conditions. *Bull de Liason* 13: 45-49
- Universidad de Costa Rica. (1997) Informe Técnico Final. In: IPGRI (ed.) Diversidad, conservación y uso sostenible de los recursos genéticos Bibliografía 196 de frutales nativos de América tropical Cooperación técnica IPGRI-BID No. ATN/SF-4356-RG. Cali, Colombia.

Universidad Nacional Agraria. (1997) Recursos genéticos de Sapotáceas en Nicaragua.
Informe final fase I. 38 p.

Vidal, H. 2000. Relaciones anatómicas y compatibilidad de *Annona muricata* L. var. Sin fibra injertada sobre diversas anonáceas. Revista Chapingo serie Horticultura 6(1): 89-96

Yuri, A. 1990. Metabolism of *Prunus* tissues affected by Ca₂ deficiency and addition of pruning. *Journal of Plant Physiology* 135: 692-697



LA TECNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA