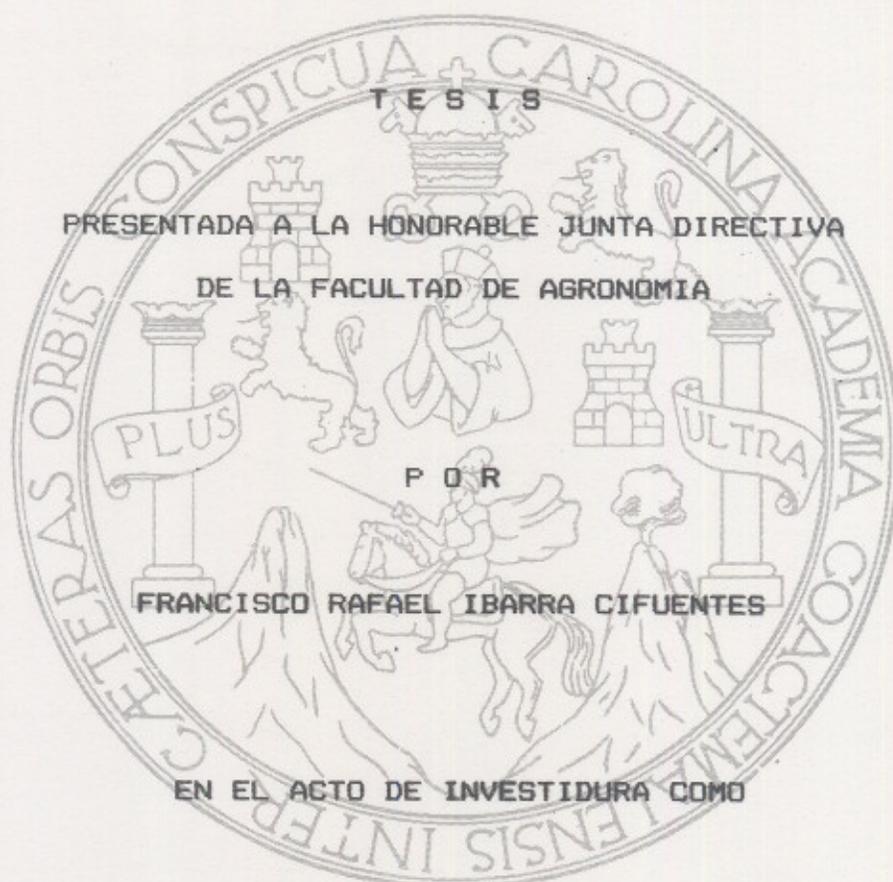


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMIA

RESPUESTA DE SIETE VARIETADES DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.)
A LA INDUCCION DE CALLO Y BROTES APICALES, A PARTIR DE
CULTIVO DE EMBRIONES INMADUROS, DERIVADO DE PLANTAS PRODUCIDAS
A PARTIR DE SEMILLA IRRADIADA CON SEIS DOSIS DE
RAYOS GAMMA (Cesio 137)



INGENIERO AGRONOMO EN SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA

EN EL GRADO ACADEMICO DE

LICENCIADO

Guatemala, octubre de 1994

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMIA

RESPOSTA DE SIETE VARIEDADES DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.)
A LA INDUCCION DE CALLO Y BROTES APICALES, A PARTIR DE
CULTIVO DE EMBRIONES INMADUROS, DERIVADO DE PLANTAS PRODUCIDAS
A PARTIR DE SEMILLA IRRADIADA CON SEIS DOSIS DE
RAYOS GAMMA (Cesio 137)

T E S I S

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA

DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

P O R

FRANCISCO RAFAEL IBARRA CIFUENTES

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO

INGENIERO AGRONOMO EN SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA

EN EL GRADO ACADÉMICO DE

LICENCIADO

Guatemala, octubre de 1994

02
01
T(1423)

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

DOCTOR JAFETH CABRERA

HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

DECANO	Ing. Agr. EFRAIN MEDINA GUERRA
VOCAL PRIMERO	Ing. Agr. MAYNOR ESTRADA ROSALES
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr. WALDEMAR NUFIO REYES
VOCAL TERCERO	Ing. Agr. CARLOS ROBERTO MOTTA
VOCAL CUARTO	Profesor GABRIEL AMADO ROSALES
VOCAL QUINTO	Br. AUGUSTO SAUL GUERRA GUTIERREZ
SECRETARIO	Ing. Agr. MARCO ROMILIO ESTRADA MUY

10
01
10457

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

DOCTOR JAFETH CABRERA

HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

Ing. Agr. EFRAIN MEDINA GUERRA	DECANO
Ing. Agr. MAYNOR ESTRADA ROSALES	VOCAL PRIMERO
Ing. Agr. WALDENOR NURIO REYES	VOCAL SEGUNDO
Ing. Agr. CARLOS ROBERTO MONTA	VOCAL TERCERO
Profesor GABRIEL AMADO ROSALES	VOCAL CUARTO
Dr. AGUSTO SAUL GUERRA BUTIERREZ	VOCAL QUINTO
Ing. Agr. MARCO DOMINGO ESTRADA MUY	SECRETARIO

Guatemala,
octubre de 1994

HONORABLE JUNTA DIRECTIVA
HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR
FACULTAD DE AGRONOMIA

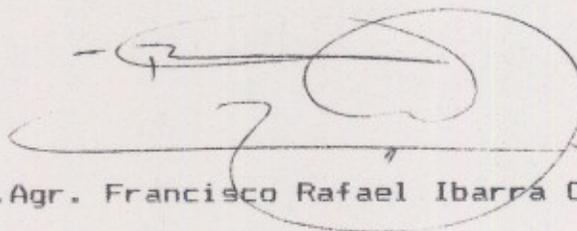
Distinguidos señores:

De conformidad con las normas establecidas en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, como requisito para optar al título de **INGENIERO AGRONOMO EN SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA** en el grado académico de **LICENCIADO**, tengo el honor de someter a la consideración de ustedes el trabajo de tesis titulado:

"RESPUESTA DE SIETE VARIETADES DE TRIGO (Triticum aestivum L.) A LA INDUCCION DE CALLO Y BROTES APICALES, A PARTIR DE CULTIVO DE EMBRIONES INMADUROS, DERIVADOS DE PLANTAS PRODUCIDAS A PARTIR DE SEMILLA IRRADIADA CON SEIS DOSIS DE RAYOS GAMMA (Cesio 137)".

Esperando que el presente trabajo de investigación merezca su aprobación, es grato presentarles las muestras de mi más alta consideración.

Respetuosamente,



P.Agr. Francisco Rafael Ibarra Cifuentes

CONTENIDO		Página
	RESUMEN	v
1.	INTRODUCCION	1
2.	MARCO TEORICO	
2.1	MARCO CONCEPTUAL	5
1.	Cultivo de trigo (<u>Triticum aestivum</u> L.)	5
1.1	Zonificación del cultivo	5
2.	Situación del cultivo en Guatemala	5
3.	Cultivo de Tejidos	7
3.1	Resumen histórico	7
3.2	Cultivo de embriones	9
3.3	Preparación de los explantes	11
3.3.1	Desinfección superficial	11
3.3.2	Disección	11
3.4	Extractos naturales de plantas y tejidos	12
3.5	Medios de cultivo	12
3.5.1	Componentes básicos	14
3.6	Condiciones de incubación	16
3.6.1	Luz	16
3.6.2	Temperatura	17
3.7	Transplante	18
3.8	Regeneración	19
4.	Aplicación de la Mutagénesis en el Mejoramiento de plantas	19
4.1	Inducción de Mutaciones	20
4.2	Tipos de Mutaciones	21

/... contenido

	Página
2.2 MARCO REFERENCIAL	21
3.9 Aplicaciones de cultivo de tejidos	
3.9.1 Mejoramiento genético	21
3.9.2 Rescate de cruces híbridos incompatibles	22
3.9.3 Micropropagación clonal	23
3.9.4 Rompimiento de dormancia y esterilidad de la semilla	25
3.10 Area experimental	
Localización	25
3.11 Material experimental	
Variedades de trigo evaluadas	26
3. HIPOTESIS	27
4. OBJETIVOS	28
5. METODOLOGIA	29
1. Desarrollo de la investigación	
1.1 Etapas	29
4. Evaluación de la investigación	
4.1 Formación de callo	36
Inducción de brotes apicales	36
Análisis de la Información	38
6. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS	39
7. CONCLUSIONES	47
8. RECOMENDACIONES	48
9. BIBLIOGRAFIA	49
10. ANEXOS	51

LISTADO DE FIGURAS

Figura No.		Página
1	Resumen de resultados expresados en medias de porcentaje	44
2	Comportamiento de las variedades en cuanto a la variable porcentaje de callos	55
3	Comportamiento de las variedades con la variable porcentaje de friabilidad	56
4	Comportamiento de las variedades con la variable porcentaje de callos crecidos	57
5	Comportamiento de las variedades con la de variable media de puntos verdes	58
6	Comportamiento de lasa variedades con relación porcentual brotes/callos	59
7	Comportamiento de las variedades con relación porcentaje de brotes	60

LISTADO DE FIGURAS

Página		Figura No.
44	Resumen de resultados expresados en medias de porcentajes	1
52	Comportamiento de las variedades en cuanto a la variable porcentaje de callos	2
56	Comportamiento de las variedades con la variable porcentaje de friabilidad	3
57	Comportamiento de las variedades con la variable porcentaje de callos crecidos	4
58	Comportamiento de las variedades con la de variable media de puntos verdes	5
59	Comportamiento de las variedades con relación porcentual protocallos	6
60	Comportamiento de las variedades con relación porcentaje de protos	7

LISTADO DE CUADROS

Cuadro No.		Página
1	Producción y rendimiento nacional del cultivo de trigo en 1978/79	5
2	Area, producción, rendimiento de trigo en Guatemala durante el período 1972-88	6
3	Porcentaje de la producción de trigo por departamento	7
4	Composición del medio de cultivo basal MS utilizado en la inducción de callos y brotes apicales	34
5	Resumen de resultados para las diferentes fases realizadas de los testigos	40
6	Resumen de medias de las diferentes variables correspondientes a las dosis de radiación de la fase 1	43
7	Resumen de medias de las diferentes variables consideradas en la fase 2	43
8	Resumen de resultados de las principales variables de la fase experimental	45
9	Resumen de medias de los datos obtenidos en la fase 3, correspondiente a las dosis de radiación	46
10	Medias por tratamiento de los resultados obtenidos en la Primera Fase	52
11	Medias por tratamiento de los resultados obtenidos de la fase dos	53
12	Resultados de la fase tres, expresados en medias por tratamiento	54

RESPUESTA DE SIETE VARIETADES DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) A
LA INDUCCION DE CALLO Y BROTES APICALES, A PARTIR
DE CULTIVO DE EMBRIONES INMADUROS DERIVADOS DE PLANTAS
PRODUCIDAS A PARTIR DE SEMILLA IRRADIADA CON SEIS DOSIS DE RAYOS
GAMMA (Cesio 137)

RESPONSE OF SEVEN WHEAT VARIETIES (*Triticum aestivum* L.)
TO CALLUS AND APICAL SHOOT INDUCTION, BY IMMATURE
EMBRYOS CULTURE, THAT ORIGINATED THE PLANTS, AFTER IRRADIATING
THE SEEDS WITH SIX DOSIS OF GAMMA RAYS
(Cesium 137)

RESUMEN

En Guatemala existe una demanda de trigo que no es satisfecha por la producción nacional. En parte por la degradación de las variedades utilizadas, debido a que los programas de fitomejoramiento están inactivos y sus procedimientos tradicionales no se modifican por falta de investigación básica principalmente en el campo de la biotecnología.

En el presente trabajo, se reporta el comportamiento de las variedades de trigo, Xequijel, Zaragoza, Comalapa, Patzún, Santa Ana, Chocoyo y Balán, a la inducción de callo y brotes apicales utilizando embriones inmaduros como explantes.

Además, se analiza el efecto de radiación sobre la respuesta a la inducción de callo y brotes apicales, de las variedades evaluadas.

El trabajo se dividió en dos partes. La primera consistió en determinar el medio adecuado para la inducción de callo y brotes apicales partiendo del protocolo base de Sharma & Gill. En la segunda parte, se aplicó radiación con rayos Gamma (Cesio 137), en dosis de 0, 5, 10, 15, 20 y 25 kilorads a la semilla que dio origen a las plantas fuente del explante, con la finalidad de observar el efecto de la radiación en la inducción de callo y brote apical.

Para determinar la metodología adecuada se utilizó material no irradiado, siguiendo el protocolo de Sharma & Gill, al cual se le modificó la fase tres, agregándole 1 mg/l de BAP.

Los tratamientos evaluados se originaron de la combinación de siete variedades y seis dosis de radiación, resultando un total de cuarenta y dos tratamientos, cada uno de ellos con diez repeticiones y, cada repetición la constituyó un frasco con diez embriones inmaduros. La primera fase fue la inducción de callo, para lo cual se utilizó como medio base el MS, suplementado con 2mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de Kinetina, en obscuridad a 26 grados centígrados, durante cuatro semanas.

Posteriormente, los callos originados se transfirieron a un medio MS, suplementado con 1 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de Kinetina en obscuridad a 26 grados centigrados, por cuatro semanas. El propósito de esta fase fue el provocar el crecimiento de los callos formados.

Los callos crecidos fueron transferidos a un medios MS, suplementado con 0.5 mg/l de 2,4-D, 0.5 mg/l de Kinetina y 1 mg/l de BAP, con 12 horas luz y una temperatura constante de 25 grados centigrados durante cuatro semanas. La finalidad de esta fase fue inducir a la brotación apical.

La inducción de callo fue bastante uniforme, teniéndose iguales resultados en las variedades Comalapa, Xequijel, Santa Ana y Zaragoza, igualando a 100 callos inducidos por cien embriones sembrados. Mientras que la variedad Chocoyo manifestó la inducción de callo más baja, siendo de 94 callos por cada 100 embriones sembrados.

Todas las variedades presentaron muy buena respuesta al crecimiento del callo y la inducción de brotes apicales por medio de embriones inmaduros, a través del protocolo de Sharma & Gill modificado. La variedad Patzún fue la que dió los mejores resultados, 60 brotes apicales por cada 100 embriones sembrados, mientras la variedad Chocoyo manifestó una producción en brotes de 50 unidades por cada 100 embriones sembrados.

Con respecto a la irradiación pudo observarse un patrón en el cual la dosis de 5 kilorads presentó la media más alta en la inducción de brotes apicales siendo de 75 unidades, mientras que 0 kilorads tuvieron 59 unidades, las dosis de 10 y 15 kilorads, 38 y 26 respectivamente y las dosis de 20 y 25 kilorads no tuvieron inducción alguna. Siendo las mutaciones cambios al azar, estos resultados pueden ser limitados a la presente investigación sin embargo, puede tomarse como referencia.

En base a lo anterior es necesario plantear estudios similares, pero a parte de conseguir la formación de callos, (que es importante debido a que puede ser material de partida para otras metodologías *in vitro*), y la inducción de brotes apicales, debe llegarse hasta la regeneración de plantas completas

La investigación se realizo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y campos del CEDA de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, con apoyo de la FAUSAC, ICTA y el Programa MOSCAMED.

RESPUESTA DE SIETE VARIEDADES DE TRIGO (Triticum aestivum) A LA
INDUCCION DE CALLO Y BROTES APICALES A PARTIR DE CULTIVO DE
EMBRIONES INMADUROS, DERIVADOS DE PLANTAS PRODUCIDAS A PARTIR DE
SEMILLA IRRADIADA CON SEIS DOSIS DE RAYOS GAMMA (Cesio 137)

1. INTRODUCCION

El trigo (Triticum aestivum L), ocupa un tercer lugar entre los cultivos de mayor importancia para la dieta alimenticia del guatemalteco. Las necesidades del mercado interno no son satisfechas por la producción nacional teniéndose que recurrir a la importación del grano.

El efecto anterior puede llegar a índices alarmantes si no se mejoran los materiales genéticos con que se cuentan, ya que además del problema demográfico, puede observarse el decrecimiento de la producción por unidad de área, (de 33 qq/Mz en 1,985 a 23 qq/Mz en 1,992). Este efecto puede deberse en gran parte a la susceptibilidad de las variedades a condiciones adversas como plagas, enfermedades, degeneración genética entre otras causas.

El Cultivo de Tejidos se presenta como una herramienta básica para apoyar a los métodos de mejoramiento genético, por lo que es indispensable determinar los procedimientos elementales que permitan dar paso a al desarrollo aplicado en el campo del mejoramiento genético.

El presente trabajo tiene el propósito de generar información básica en el campo de cultivo de tejidos in vitro para el cultivo de trigo (Triticum aestivum L), para ser incorporada posteriormente a programas de mejoramiento, fue desarrollado en el laboratorio de Cultivo de Tejidos y campos del CEDA de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

El desarrollo del trabajo se realizó en dos partes. Primero, la determinación de un protocolo adecuado para la inducción de callo y brotes apicales, y segundo, la observación del efecto causado por la radiación en esa respuesta. Se trabajó con siete variedades de trigo (Balán, Xequijel, Santa Ana, Zaragoza, Chocoyo, Patzún y Comalapa) y el protocolo de Sharma & Gill como base. Este consta de cuatro fases, dos en obscuridad y dos con 12 horas luz, todas las fases fueron suplementadas con 2,4-D y Kinetina, siendo modificado en la fase tres con la suplementación de 1 mg/l de BAP.

La radiación fue aplicada a la semilla, que posteriormente fue sembrada y cultivada hasta producir embriones inmaduros que fueron los explantes utilizados. Las dosis utilizados fueron de 0, 5, 10, 15, 20, 25 kilorads.

Dentro de los resultados alcanzados, tenemos la respuesta positiva de la variedades evaluadas a la inducción de callo y brotes apicales, utilizando como explante embriones inmaduros a través del protocolo de Sharma & Gill modificado. La variedad Patzún mostró mayor respuesta, siendo la más baja en resultados la variedad Chocoyo en forma general.

La irradiación causó un efecto sobre la inducción de callo y brotes apicales, de tal forma que dosis entre 0 y 10 kilorads son beneficiosas, dosis mayores de 10 y menores de 20 kilorads son desventajosas y dosis iguales o mayores que 20 kilorads son deletéreas.

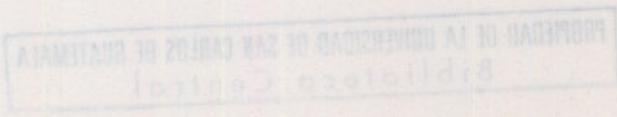
El efecto anterior puede llegar a indicar al momento si no se mejoran los estadísticos genéticos con que se cuentan, ya que además del proceso demográfico, puede observarse el decrecimiento de la producción por unidad de área, 1 de 22 por Ha en 1985 a 22 por Ha en 1992. Este efecto puede deberse en gran parte a la susceptibilidad de las variedades a condiciones adversas como plagas, enfermedades, degeneración genética entre otras causas.

El cultivo de tejidos se presenta como una herramienta básica para apoyar a los métodos de mejoramiento genético, por lo que es indispensable determinar los procedimientos elementales que permitan dar paso a su desarrollo aplicado en el campo del mejoramiento genético.

El presente trabajo tiene el propósito de generar información básica en el campo de cultivo de tejidos in vitro para el cultivo de trigo (Triticum aestivum L.) para ser incorporada posteriormente a programas de mejoramiento, que desarrollados en el laboratorio de Cultivo de Tejidos y Campos del CEBA de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

El desarrollo del trabajo se realizó en dos partes. Primero, la determinación de un protocolo adecuado para la inducción de callo y brotes apicales, y segundo, la observación del efecto causado por la radiación en esas respuestas. Se trabajó con siete variedades de trigo (Baler, Japitel, Santa Ana, Jarsoz, Chocoyo, Patzún y Compañero) y el protocolo de Sharma & Gill como base. Este consta de cuatro fases, dos en oscuridad y dos con 12 horas luz, todas las fases fueron repetidas con 2, 4, 8 y 16 mg/l siendo modificadas en la fase tres con la suplementación de 1 mg/l de BAP.

La radiación fue aplicada a la semilla, que posteriormente fue sembrada y cultivada hasta producir embriones inmaduros que fueron los explantes utilizados. Los datos utilizados fueron de 0, 2, 4, 8, 16, 20, 25 kilorads.



2. MARCO TEORICO

2.1 MARCO CONCEPTUAL

1. Cultivo de trigo (Triticum aestivum L.)

1.1 Zonificación del cultivo

Existen dos zonas agrícolas las cuales son las áreas de mayor importancia en producción. La primera abarca los departamentos de Quetzaltenango, San Marcos, Totonicapán, Sololá, Huehuetenango y Quiché, y la segunda, Chimaltenango, Guatemala y Jalapa (6,10,).

En el cuadro 1, se muestra la producción y rendimiento del cultivo del trigo. Se observa que en 1979 existían 45,019 fincas, las cuales ocupaban una superficie sembrada de 26,579 has. El rendimiento reportado es bajo debido a que es un cultivo que se siembra en áreas pequeñas (6,10).

CUADRO 1 Producción y rendimiento nacional del cultivo de trigo, año 78 / 79

DEPARTAMENTO	No. DE FINCAS	SUPERFICIE (ha)	PRODUCCION (ton) miles	ton/ha
Quetzaltenango	9076	6167.0	10.35	1.67
San Marcos	12933	6711.6	8.36	1.24
Chimaltenango	5452	4027.8	7.31	1.81
Huehuetenango	6632	4116.7	4.31	1.05
Totonicapán	5724	2251.9	3.82	1.70
Sololá	3444	1787.1	1.28	0.72
Guatemala	24	238.0	0.77	3.23
Quiché	1049	569.1	0.70	1.23
Jalapa	641	448.1	0.64	1.43
Santa Rosa	21	133.7	0.34	2.54
Sacatepéquez	19	119.0	0.24	2.02
Baja Verapaz	3	8.4	0.01	1.19
Cobán	1	0.35	2 X 10 ⁻⁴	0.57
TOTAL	45019	26579.35	38.13	20.40

FUENTE: Censo Nacional Agropecuario 1979

2. Situación del cultivo de trigo en Guatemala

Durante los últimos diez años, la producción de trigo ha sido de 417,835 ton producidas en una extensión de 245,560 has, lo cual da una producción promedio de 1.70 ton/ha/año. En el cuadro 2 se muestra el área cultivada, producción total rendimiento de trigo en Guatemala (6,10).

Cuadro 2: Area, producción, rendimiento e importación de trigo.

Año Agrícola	Area Cosecha da (miles de Mz.)	Produc- ción (miles de qq)	Rendi- miento (qq/Mz)	Año Natural	Importaciones	
					Miles qq	Miles U.S \$
1,984/85	46	1100.00	23.9	1,984	2696.8	24489.0
1,985/86	45	1500.00	33.3	1,985	2944.9	24889.3
1,986/87	46	1170.00	25.4	1,986	2676.3	19371.9
1,987/88	48	1200.00	25	1,987	3303.3	23031.7
1,988/89	40.6	945.50	23.3	1,988	2469.6	19210.6
1,989/90	27.5	706.20	25.7	1,989	2895.3	26488.8
1,990/91	21.7	500.00	23.0	1,990	3593.2	29185.2
1,991/92	22.4	500.00	22.3	1,991	4340.2	24011.4
1,992/93	23.3	535.00	23.0	1,992	4124.3	32373.4
1,993/94	30.3	700.00	23.1	1,993	2294.4	19319.0

Fuente: Instituto Nacional de Estadística, Gremial Nacional de Trigueros y Banco de Guatemala.

El crecimiento del área desde 1973 a 1988 ha sido negativa con un valor de -0.06%, el rendimiento ha aumentado en un 0.02% y la producción total se ha incrementado en un 0.6%. El cuadro 3 muestra el porcentaje de la producción de trigo por departamento (6,10).

CUADRO 3. Porcentaje de la producción de trigo por departamento, 1,982.

Departamento	Producción [%]
Quetzaltenango	30.8
Chimaltenango	20.7
San Marcos	15.3
Totonicapán	13.4
Huehuetenango	6.0
Sololá	7.8
Jalapa	2.1
Quiché	1.5
Sacatepéquez	1.1
Guatemala	1.0
Santa Rosa	0.3
TOTAL	100.0%

Fuente: Gremial Nacional de Trigueros. Depto. de Estadística, 1,986.

3. Cultivo de Tejidos

3.1. Resumen Histórico

A lo largo de la historia, se han venido sucediendo eventos que han permitido llegar a los avances actuales en el cultivo de tejidos. Así, por ejemplo Hooke en 1665 (15), descubre la célula; Leeuwenhoek en 1674 (15), descubre el microscopio y permite la observación de la vida microscópica; von Mohl en 1835 (23), describe la división celular; Schleiden y Schwann en 1838-39 (25)

formulan la teoría celular; Haberlandt en 1898 (24), realizó los primeros cultivos de células (mesófilo).

Hannig en 1904, publicó un artículo que abrió el campo del cultivo de embriones para explotación y aplicaciones agrícolas; él usó técnicas completamente asépticas para cultivar embriones relativamente maduros de Raphanus y Cochlearia en un medio de sal mineral suplementado con azúcar, obteniendo plantas transplantables. Desde entonces, el cultivo de embriones ha sido utilizado para alcanzar las siguientes metas: Conocer los requerimientos físicos y nutricionales para el desarrollo embrionario; para "desviar" la dormancia de la semilla, lo cual reduciría el ciclo del cultivo; probar la viabilidad de la semilla; proveer una fuente de material de clonación; y para rescatar embriones híbridos inmaduros de un cruce incompatible (24,25).

La última aplicación es la que se ha utilizado más ampliamente. Numerosos investigadores han escrito y experimentado sobre estas técnicas desde que Hannig principió.

Kotte (1922) llevó a cabo el cultivo de ápices de raíces; Robbins, el mismo año realiza el cultivo de raíces; Went (1926) descubre las auxinas, hormonas de primordial importancia para el cultivo de tejidos; Juster (1928) realizó trabajos con protoplastos obtenidos mecánicamente; White (1934) logró el crecimiento activo de raíces; Gautheret, el mismo año, realizó cultivos a partir de cambium de plantas leñosas; White (1937) descubrió la importancia de la vitamina B para el desarrollo de raíces; van Overbeek en 1942 (19), logró el rescate de embriones de cruces

interespecíficos; Steward (1952) incorporó agua de coco al medio de cultivo; Muir (1953) realizó el cultivo de suspensiones celulares y el aislamiento de células individuales. Tulecke, ese mismo año utilizó anteras para el cultivo de polen; Skooge (1953-55) descubre las kinetinas; Skoog y Miller (1957) obtienen regeneración de plantas a partir de callos. En 1962, Murashige y Skoog establecen el medio de cultivo a partir del cultivo de tabaco; en 1964, Morel logra la eliminación de virus mediante el cultivo de meristemas; Guha y Maheshwary (1964) obtienen plantas haploides a partir de anteras, entre otros avances reportados (6).

Una lista de 72 géneros de embriones de plantas que han sido cultivados *in vitro*, ha sido compilada por Pierik, 1979 (15,17).

3.2 Cultivo de Embriones

Los métodos de cultivo de tejidos fueron desarrollados para inducir a la reproducción y para el mantenimiento de callos embriogénicos. Los callos embriogénicos se obtuvieron al cultivar las semillas y embriones maduros en un medio Linsmaier y Skoog (LS), conteniendo 5 ó 2 mg/L de 2,4-D, respectivamente (19).

La regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos se ha alcanzado luego de varios estudios cuantificándose en peso fresco. Fenotípicamente, se han regenerado plantas normales en un medio LS suplementado con 0.1 mg/L de ácido indolacético más 0.5mg/L de benziladenina (BA) (3,15,21).

Existen varias posibilidades para el cultivo de embriones *in vitro*. En algunos casos, se han establecido métodos a partir de embriones inmaduros, para la obtención de plantas. En otros casos, se han utilizado embriones ya maduros. Ambas vías han

sido combinadas con la técnica de inducción de mutaciones, con el fin de aumentar la variabilidad genética disponible en un cultivo (3,5,21).

Algunos resultados importantes han sido obtenidos en cultivos como papa, tabaco y arroz (GAO, Liang y Chen, 1985 (21)). Existen dos posibilidades básicas para el tratamiento de embriones y su cultivo in vitro. Se puede irradiar semillas y luego, extraer los embriones y cultivarlos in vitro. Este método no difiere in vivo en cuanto a las posibilidades de producir mutaciones. La diferencia en esta vía está en la posibilidad de aumento de la variabilidad, inducida por el efecto aditivo de la variación somacional y, la expresión de caracteres propios de los sistemas in vitro. La otra posibilidad consiste en utilizar los embriones de la M_2 , M_3 , o cualquier otra progenie según el caso (15,21).

La propiedad de las células formadoras de callo en cereales para formar embriones somáticos, parece haberse perdido en el desarrollo de la fuente del explante (19). Esto sugiere que los tejidos inmaduros son los explantes a elegir, para así asegurar la producción de callos embriogénicos con alta eficiencia para la formación de plantas.

Algunos estudios buscan el detalle de métodos confiables para el establecimiento de callos embriogénicos regenerables, a partir del cultivo de embriones maduros desarrollados e inmaduros (19).

En un estudio previo, se encontró que el escutelo de embriones inmaduros de trigo no proliferan o forman callo (17). Esto nos indica que no es importante que el escutelo esté o no presente, siempre y cuando el embrión tenga un contacto directo

con el medio es decir, que el escutelo debe quedar por encima del embrión (21).

3.3 Preparación de los Explantes

3.3.1 Desinfección Superficial

Los embriones de plantas con semilla no es necesario desinfectarlos directamente, ya que el ambiente dentro del que se encuentran es estéril, a menos de que se rompa su cubierta o se sepa de algún patógeno que se halle en el interior de la cubierta. Los óvulos enteros, semillas o frutos, son desinfectados superficialmente, y los embriones son extraídos asépticamente de las cubiertas que los rodean. La contaminación en el cultivo de embriones es mucho menor que en otro tipo de explantes (2,6,16).

3.3.2 Disección

La disección debe realizarse en un ambiente aséptico. Para disectar pequeños embriones, se necesita de un estéreo-microscopio, con una lámpara de luz fluorescente fría o su equivalente.

El equipo utilizado comúnmente para disección es: fórceps, agujas de disección, escalpelos, hojas de afeitar y pipetas Pasteur. Las herramientas pueden desinfectarse inicialmente con calor (a la flama), en la autoclave, o con etanol al 70-75%. Cada vez que se utiliza una herramienta debe esterilizarse sumergiéndola en etanol al 70-75%, luego flamear para quitar el exceso de etanol o con una toalla de papel (3,21).

La escisión de un embrión inmaduro que se halla sumergido en endospermo, implica la incisión del extremo micropilar del óvulo joven y hacer presión en el extremo opuesto, forzando al embrión

a salir a través del corte. Se debe tener cuidado de no lastimar al tejido embrionario al hacer presión (3,21).

3.4 Extractos naturales de plantas y tejidos

Una adición directa del tejido del endospermo al medio de cultivo puede también inducir resultados positivos en el cultivo de tejidos inmaduros. Embriones extraídos a partir de cariópsides jóvenes de Hordeum y Triticum han sido cultivados con éxito en un medio conteniendo el endospermo lechoso de maíz (3). Un crecimiento persistente, promoviendo el efecto del endospermo maternal, se ha notado en el crecimiento de embriones híbridos de Hordeum y Triticum de 0.2 mm de largo o menos, colocados en otro cruce incompatible de Triticum X Secale, sobre una capa macerada de endospermo inmaduro de Triticum, observándose un incremento considerable en el tamaño (3).

3.5 Medios de Cultivo

Los embriones extraídos en o cerca de la fase de maduración son autotróficos completamente; ellos germinarán y crecerán en un medio simple inorgánico con una fuente de energía añadida, sucrosa. Progresivamente, si embriones más jóvenes son extraídos, los requerimientos se vuelven sucesivamente más complejos y sofisticados, para permitir el desarrollo del potencial total del embrión.

Raghavan (1965), estableció que el desarrollo del embrión de hetero a autotrófico, dependía de la activación progresiva de sistemas críticos de enzimas o etapas bioquímicas, concernientes especialmente a la síntesis de proteínas y/o sustancias del

crecimiento (1). Lo más importante en el cultivo de embriones inmaduros, es el definir el medio de cultivo que pueda mantener el crecimiento y desarrollo de esos embriones, esto basándose en medios de cultivo publicados y haciendo modificaciones empíricas (1).

El mayor esfuerzo que se ha hecho desde el inicio de esta técnica, es el de la supresión in vitro de una "germinación precoz" de los embriones inmaduros extraídos. LaRue y Avery en 1938 (17), descubrieron que las plántulas germinadas precozmente eran débiles, mostrando sólo aquellas estructuras ya presentes al momento de escindir el embrión.

Norstog en 1979 (21), resumió los factores capaces de suprimir la germinación precoz de varias especies: presión osmótica alta, nivel elevado de potasio, medio amplio de nitrógeno en forma de sal de amonio o un ácido orgánico, ABA y, posiblemente, tensión baja de oxígeno.

Durante el desarrollo de los embriones inmaduros en el cultivo, se esperan cambios progresivos en los requerimientos nutricionales. Esto significa transferir el embrión de un medio a otro para un crecimiento óptimo. Monnier en 1978 (5), inventó una forma de variación continua en la composición del medio conforme el tiempo. Preparando dos medios de cultivo diferentes colocados juxtapuestos en una caja de Petri. El primer medio de agar se añadió alrededor de un vaso contenedor de vidrio pequeño, en el centro del plato del medio. Luego de solidificado el medio de agar, el vaso central fue removido. En el hoyo resultante se agregó el segundo medio, cultivándose los embriones extraídos en

este segundo medio. Como resultado de esta difusión, los embriones estaban sujetos a la acción de un medio variable con el tiempo, sin interrupción .

3.5.1 Componentes Básicos del Medio de Cultivo

3.5.1.1 Sales inorgánicas

Norstog citado por Mackinnon (18), encontró que una alta concentración de potasio era capaz de suprimir la germinación precoz de todos los embriones de Hordeum, aumentando marcadamente la tasa de supervivencia sin utilizar un medio de alta tasa de presión osmótica. Mommier, también citado por Mackinnon, modificó el medio MS incrementando el potasio (añadiendo 350 mg/l de cloruro de potasio), y los niveles de calcio (duplicando la concentración de cloruro de calcio), reduciendo los niveles de amonio (NH_4NO_3) y del FeEDTA a un medio de su concentración normal y duplicando la concentración de los micronutrientes, logrando mayor supervivencia del embrión y anulación de la germinación precoz.

3.5.1.2 Carbohidratos

La sucrosa es la más utilizada como fuente de energía; la glucosa también puede ser buena. Los carbohidratos juegan un papel importante en el mantenimiento de la presión osmótica en el medio de cultivo. Concentraciones elevadas de sucrosa en el medio, han sido utilizadas en el cultivo de embriones inmaduros y resultó ser efectiva para promover el desarrollo embrionario y suprimir la germinación precoz (15,20,25). Generalizando, mientras más joven se escinde el embrión mayor es la presión osmótica requerida.

3.5.1.3 Nitrógeno

Nitrato de amonio, (NH_4NO_3), y nitrato de potasio, (KNO_3), son frecuentemente utilizados como fuentes de nitrógeno inorgánico en el cultivo de embriones. La utilización de nitrógeno en el cultivo difiere según las especies y la madurez de la planta.

Dentro de todos los aminoácidos y sus amidas, la glutamina ha sido la más efectiva en la estimulación del crecimiento del embrión. En algunos taxa, la asparagina también resultó efectiva.

La caseína hidrolizada es un complejo mixto de aminoácidos, utilizado en un medio de cultivo de embriones para estimular el crecimiento. Si se incrementa en un 10% de sucrosa, no existe un soporte normal del desarrollo embriogénico. Sin embargo, cuando 400 mg/L de caseína hidrolizada, se añaden al medio basal, el 80% de los embriones desarrollan normalmente y formando embriones maduros en 3-4 semanas. La caseína hidrolizada también ha sido utilizada como medio aditivo en cultivos de embriones jóvenes de Triticale, Cucumis y Oryza, para prevenir la germinación precoz y estimular el desarrollo embriológico (24).

3.5.1.4 Reguladores del Crecimiento

Generalmente no son necesarios en el medio de cultivo, a menos que los embriones sean muy jóvenes y en una multiplicación clonal. En estos casos son utilizados para suprimir una germinación precoz o para estimular el crecimiento embriológico. El ABA (ácido abscísico), está presente normalmente en el desarrollo del óvulo, suprimiendo la germinación precoz y manteniendo el desarrollo del embrión en un curso normal de embrionía. Cuando el ABA se usa para evitar la germinación precoz, el mantenimiento

de una alta presión osmótica en el medio ya no es necesaria. En comparación con el ABA, las giberelinas y citocininas tienen un efecto opuesto sobre la germinación precoz. Dependiendo de la especie, los embriones muy jóvenes pueden estimularse, ya sea con citocininas, auxinas o giberelinas. Las auxinas exógenas parecen no necesitarse para el crecimiento in vitro de embriones. Se ha reportado que las citocininas combinadas con ácido indolacético (IAA) promueven el crecimiento y diferenciación de embriones de Capsella (24,25).

3.6 Condiciones de Incubación

Los factores externos que interesan en las condiciones de incubación son: luz y temperatura. Para determinar la cantidad de luz y temperatura adecuadas que se requieren para un cultivo, se necesita de incubadoras controladas y cámaras de crecimiento. Algunos laboratorios elevan la humedad relativa de la cámara de incubación para retardar la tasa de desecación del medio. A veces, el ajustar la humedad relativa de la cámara puede alargar el período entre subcultivos, pero no es esencial para el éxito del cultivo. Al contrario, una humedad relativa muy elevada puede acelerar el crecimiento de microorganismos, y así acrecentar la oportunidad de contaminación (23,24,25).

3.6.1 Luz

La luz es necesaria para inducir una germinación natural. Una forma arbitraria para determinar luz versus obscuridad de incubación, es examinar la naturaleza de la estructura de la cubierta in situ que rodea el embrión que se está desarrollando.

Es seguro optar por la incubación en la obscuridad, si

el tejido de la cubierta es del grueso suficiente para que un pequeño rayo de sol pueda penetrar a través de él; y optar por la luz de incubación, si la cubierta es permeable a la luz. Esto no significa necesariamente que la condición opuesta no resultará en un crecimiento mejor. Debido a que a que la luz puede inducir a la germinación precoz, es aconsejable incubar a los embriones inmaduros en la oscuridad durante el período de embriogénesis, antes de transferirlos a la luz para su germinación.

Este procedimiento ha sido usado en un híbrido interespecífico de Allium, barley, Aegilops X híbrido de Hordeum (18).

La mayoría de embriones pueden crecer tanto bajo condiciones de oscuridad como de luz, pero hay algunos que sólo pueden bajo una de las dos condiciones.

La luz de incubación puede ser bajo un regimen de luz constante o día/noche. Cuando éste es adoptado, la duración del fotoperíodo es seleccionado de una forma arbitraria, puede ser 16 horas de luz y 8 de oscuridad (16:8); 12:12; otros pocos escogen 20:4 ó 18:6 (18).

3.6.2 Temperatura

Comparado con las semillas intactas, los embriones aislados frecuentemente tienen un rango muy amplio para la germinación. La mayoría elige una temperatura de incubación de 25 +- 2 °C, no importando el tipo de planta. Esto parece un tanto satisfactorio, al ayudar al crecimiento embriónico y a la germinación en general, a pesar de que no es necesario lo óptimo. Lo óptimo debe determinarse empíricamente para cada tipo de cultivo. Desafortunadamente, aún dentro de una misma especie, la temperatura

óptima no solamente varía significativamente con el genotipo, sino también con cada parámetro del crecimiento (p.e. largo de raíz, de meristemo, peso fresco y peso seco).

Han sido utilizadas tanto el régimen constante o fluctuante de día/noche. No hay evidencia sólida de que una caída en la temperatura en la noche (temperatura fluctuante) pueda beneficiar el desarrollo in vitro del embrión (18,24,).

3.7 Transplante

Los factores a considerar son: infección y desecación.

El esterilizar el suelo (mezcla de suelo), elimina el serio problema de la infección. La desecación al transplantar es un gran problema en el cultivo de embriones. Una pérdida excesiva de agua se vió en las hojas de las plantas luego de transplantarlas de sus contenedores de cultivo. Esta pérdida está relacionada con: (1) reducción de la cantidad de cera epicuticular; (2) el gran volumen de espacios intercelulares del mesófilo, y; (3) la lentitud de la respuesta estomatal hacia el estrés hídrico, para el desarrollo in vitro de las plántulas.

Por lo tanto, se requiere de un período de aclimatación de humedad para las plántulas transplantadas para que se adapten al ambiente externo. Durante la aclimatación, la humedad es reducida gradualmente por un período de 2-3 semanas (23,24,25).

Mientras tanto, las plántulas pasan por adaptaciones morfológicas y fisiológicas, que les permitan desarrollar un control hídrico típico de plantas terrestres.

La mayoría de plántulas del cultivo in vitro poseen sólo 1 ó 2 largas y delgadas raíces, y si son dañadas durante el transplante, éstas mueren. Para incrementar la oportunidad de

supervivencia durante el establecimiento de las plántulas germinadas, Stoltz (1977), encontró que la adición de 0.5 μ M de ácido naftalenacético (NAA), aumentaba significativamente el número de raíces por planta, de 1.8 (control) a 6.3, sin producir callo, el cual podría ser susceptible a pudrirse al transplantar las plántulas al suelo (21).

3.8 Regeneración

Para regenerar una planta completa, deben transferirse callos embriogénicos a medios de regeneración, pudiéndose utilizar 0.02 g de callo por 10 ml de medio, en algunos materiales se han presentado buenos resultados, utilizando la combinación hormonal de 0.01 mg/L de IAA más 0.5 de mg/L de BAP (20).

Según Perea y Navarro (19), la regeneración debe realizarse en dos etapas, variando el medio de cultivo en las concentraciones de kinetina y 2,4-D, de tal forma que, la regeneración de tallo se dé bajo un equilibrio de éstas y la regeneración de la raíz, bajo una concentración de kinetina sin presencia de 2,4-D.

4. Aplicación de la Mutagénesis en el mejoramiento de plantas mediante técnicas in vitro.

Las mutaciones inducidas han constituido una valiosa herramienta para los fitomejoradores. Al ampliarse la variabilidad genética de los cultivos, han aumentado la posibilidad de realizar selección con mayor eficiencia en la solución de los problemas que presentan los mismos. (19)

La posibilidad de utilizar caracteres genéticos producidos por mutaciones inducidas, está basado en la reproducción del

material producido . La base se encuentra en la posibilidad de utilizar la oportunidad de duplicación del ADN, por inducir mutaciones y/o la facilidad en la multiplicación en masa o clonal.

Por lo anterior, los mecanismos utilizados por las plantas para su reproducción (totipotencia), pueden ser utilizados para producir células, tejidos u órganos mutados y con ello nuevos organismos . Por otro lado, el cultivo in vitro , ofrece la posibilidad de selección a niveles iniciales de diferenciación de tejidos tratados con mutágenos (17).

La viabilidad del uso de la mutagénesis en la fitotécnia para la mejora de cultivares de arroz, trigo, y centeno ya ha quedado demostrada en diversos países, entre ellos China, Checoslovaquia, India, Indonesia, Italia, Japón y los Estados Unidos. Consiguiéndose en total unos 240 materiales, distribuidos entre los agricultores entre 1,976 y 1992 (17).

4.1 Inducción de Mutaciones

La inducción de mutaciones, puede combinarse con el cultivo in vitro , con fines de mejoramiento genético. El proceso puede tener varias vías entre ellas:

La primera, puede consistir en la aplicación de mutágenos físicos o químicos directamente a la semilla utilizando la progenie, con su respectiva selección, además puede seleccionarse el tipo de explante deseado, pudiendo ser desde la semilla o parte de esta hasta estructuras especializadas como anteras, estilos, tallos , hojas entre otros.

La segunda, consiste en la aplicación de los mutágenos

directamente a los tejidos que entrarán al proceso in vitro, teniéndose la limitante que las dosis utilizadas deben ser significativamente más pequeñas que las utilizadas en el método anterior. Luego puede aplicarse los agentes mutágenos a los productos de cultivo in vitro, tales como callos, células en suspensión entre otros, teniendo el inconveniente de que el manejo de los mismos es mucho más difícil, ya que presenta el problema de la contaminación.

4.2 Tipos de Mutaciones Frecuentes

La mutación cromosómica es la más frecuente en esta línea de operaciones, pudiéndose dar inversiones y translocaciones principalmente, esto nos indica que una buena porción de genes serán afectados, por lo que cobra importancia la ingeniería genética para sobrepasar este obstáculo que en la mayoría de los casos es desventajoso.

La mutación génica puede presentarse, pero en menor grado lo que la hace menos importante dentro del mejoramiento genético combinado (17).

IV.2 MARCO REFERENCIAL

3.9 Aplicaciones del Cultivo de Tejidos

3.9.1 Mejoramiento Genético

Una de las técnicas más útiles para el mejoramiento genético de las plantas, lo constituyen los métodos de selección in vitro. Normalmente, los métodos de selección de campo requieren de mucho trabajo y tiempo. Además, los resultados pueden ser afectados por numerosos factores que resultan de difícil control para el investigador (2,6,15,).

Los sistemas in vitro permiten un control de los factores externos a los genotipos, por lo que se pueden obtener respuestas más claras y, además permiten la utilización de grandes poblaciones de segregantes para la selección de mutantes. Esto, porque en vez de utilizar plantas completas, podemos utilizar pequeñas porciones de tejido o inclusive células en suspensión (19).

La selección in vitro resulta más eficiente por su base bioquímica de la relación planta-sustrato, entendiendo como parte del sustrato, la presencia de la toxina de un patógeno o la sustancia que produce estrés a la planta (17).

Los caracteres de importancia agroquímica que más fácilmente pueden ser mejorados mediante la selección de mutantes in vitro son:

- 1) Eficiencia en la utilización de nutrientes esenciales.
- 2) Eficiencia en la fijación del carbono y su utilización.
- 3) Calidad nutricional del cultivo.
- 4) Resistencia al estrés inducido por bajas o altas temperaturas.
- 5) Resistencia al exceso de humedad.
- 6) Resistencia al estrés por inundación.
- 7) Resistencia a toxicidad producida por metales o contaminantes químicos.
- 8) Resistencia a enfermedades.
- 9) Resistencia a plagas.

3.9.2 Rescate de cruces de híbridos incompatibles

Al realizar las multiplicaciones, los cruces interespecíficos e intergenéricos se llevan a cabo transfiriendo valiosos genes de especies silvestres a especies cultivadas. En estos cruces, es normal encontrar incompatibilidad, y resulta en semillas marchitas conteniendo embriones abortivos.

La falla anatómica post-fertilización o post-cigótica es referida como esterilidad somatoplástica. Wardlaw dice "en las

semillas abortivas de muchos híbridos interespecíficos, las primeras señales de un desarrollo anormal típico, aparecen en el endospermo". La falla del desarrollo del endospermo eventualmente conduce hacia la desnutrición y aborto del embrión. Las fallas postcigóticas pueden resultar de la incompatibilidad embrión-endospermo, donde el buen desarrollo del endospermo produce toxinas que matan al embrión. El cultivo de embriones híbridos antes de abortar, puede ayudar a sobrepasar las barreras post-cigóticas (3).

La etapa de desarrollo del embrión al momento del cultivo es importante: mientras menos maduros son los embriones, más difícil y complejo será el requerimiento nutricional.

Esta técnica es más usada en el cultivo de cereales. Un ejemplo sería, Aegilops squarosa X Triticum boeoticum plantas híbridas. Aquí el aborto de las semillas no resultan por una división nuclear anormal en el endospermo híbrido, aparentemente el bloque que conduce al endospermo abortivo híbrido, es efectivo entre los días 5 y 10 del desarrollo de la semilla. La falta de síntesis de proteínas almacenadoras por el décimo día, indica que el aborto del endospermo híbrido se completó. Cerca de 200 embriones fueron cultivados en los días 10-12 y se obtuvieron 6 híbridos viables (18).

3.9.3 Micropropagación clonal

La capacidad regenerativa es esencial en la manipulación genética no tradicional y en métodos de cultivo. Debido a la naturaleza joven del tejido con un alto potencial regenerativo, los embriones son excelente material para la propagación clonal

in vitro. En las gramíneas, aún en las plántulas recién germinadas, se ha perdido su totipotencialidad.

Ambos fenómenos, organogénesis y embriogénesis somática, han sido inducidas en cereales mayores y gramíneas forrageras para tejidos embriogénicos.

Similar a la inducción somática del embrión en zanahorias, el 2,4-D ha sido probado como el más potente compuesto para estimular la expresión de totipotencialidad en cultivos y subsecuentes cultivos de gramíneas (p.e. maíz, sorgo). Otros reportaron que la auxina 2,4,5-T era mucho más potente que el 2,4-D en la regeneración de callos en avena.

Los callos con su potencial morfogenético, usualmente se derivan del tejido escutelar de embriones inmaduros, los cuales deben ser colocados en una superficie de agar con el escutelo viendo hacia arriba. Cuando los embriones inmaduros se colocan con el escutelo hacia abajo, en contacto con el medio, el callo embriogénico, en lugar de desarrollarse del escutelo, lo hace de la región nodal del axis del embrión en maíz.

Los callos con capacidad organogénica y embriogénica, proliferaron de la coleorriza de una planta con embriones maduros.

Los callos regenerativos en las gramíneas fueron usualmente compactos y opacos, con superficies suaves. Green (1982), obtuvo callos friables con un alto grado de actividad embriogénica derivada de la superficie escutelar de embriones inmaduros de maíz. El potencial morfogenético se mantuvo a través de los subcultivos (15).

3.9.4 Rompimiento de la dormancia y esterilidad de la semilla

La esterilidad se debe a inhibidores químicos y a la resistencia mecánica presente en las estructuras que cubren al embrión, y no a la dormancia del embrión. La esterilidad puede deberse a un desarrollo incompleto del embrión, mutaciones en la cobertura del embrión, que puede resultar en muerte del embrión germinado o un recalcitrante tipo de dormancia. Estas técnicas se basan en los procedimientos de incubación (15,24).

3.10 Localización del Area de Experimentación

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y el Centro Experimental Docente de la Facultad de Agronomía (CEDA), Universidad de San Carlos de Guatemala, Ciudad Universitaria, zona 12, Guatemala.

Según De La Cruz S., J. R. (7), basado en el sistema de clasificación de zonas de vida de Guatemala del Dr. L.R. Holdridge, el CEDA se ubica dentro de la zona de vida Bosque Montano Bajo Subtropical. Los suelos según Simmons (22), pertenecen a la serie Guatemala, caracterizados por ser de textura y consistencia franco arcillosa friable, formados por cenizas volcánicas. El CEDA se localiza en la parte sur de la Ciudad Universitaria, 14° 34'51" LN y 90° 33'16" LW, a una elevación de 1,476 m.s.n.m. (22). Cuenta con una precipitación media anual de 1,247 mm y una temperatura media anual de 18 C. (22)

El Laboratorio de Cultivo de Tejidos cuenta con un área de recepción, un cuarto de transferencia o siembra, equipado con una cámara de flujo laminar de aire, un cuarto de preparación

de medios con equipo, cristalería y reactivos; también con un cuarto de crecimiento equipado con sistema de iluminación y control de temperatura, estanterías metálicas y dos incubadoras con control de luz y temperatura. Además, cuenta con un sistema de aire acondicionado.

3.11 Material Experimental

Variedades de trigo evaluadas

Para la presente investigación se utilizaron siete variedades de trigo (Triticum aestivum L.), provenientes de semilla certificada del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Agrícola -ICTA- de Chimaltenango y Quetzaltenango. Las características principales de las variedades estudiadas se presentan a

continuación:

3.11.1 Xequijel: Variedad que crece adecuadamente a 2,150 msnm. y a temperaturas de 19-25 °C. Alcanza alturas de tallos entre 1 y 1.1 m. de la base del tallo al extremo distal de la espiga. La madurez fisiológica ocurre entre 123 y 129 días después de la siembra. El peso específico del grano es de 77.5 kilogramos por hectolitro (7.75 gr./cc) y tiene un rendimiento que varía entre 3.5 a 4.3 toneladas por hectárea (9,10).

3.11.2 Chocoyo: Variedad adaptada a una altura media de 2,150 msnm, y temperaturas entre 18-26 °C. Alcanza alturas de tallo entre los 0.95 y 1.45 m. medidos a partir de de la base hacia la parte distal de la espiga. La madurez fisiológica la alcanza entre 135-145 días después de la siembra, por lo que se considera como una variedad tardía, su peso específico es de 76.4

kilogramos por hectolitro (7.6 gr./cc), posee un rendimiento que varía entre 3.5 a 4.3 toneladas por hectárea. Está clasificada como una variedad de porte enano, alta mente susceptible a las royas de las gramíneas (14).

3.11.3 Balán: Variedad de trigo semi-suave, recomendado para alturas entre 1,525 y 1,980 msnm. Su rendimiento promedio es de 3.89 toneladas por hectárea, alcanza su madurez fisiológica a los 120 días después de la siembra, variedad de madurez media. Peso específico de 71.88 kilogramos por hectolitro (7.18 gr/cc). La planta presenta las siguientes características:

0.80 m. de altura de tallo, 4-6 tallos por macolla, pubescencia de la gluma ausente, color del grano rojo, grano de forma oval, tallo cremoso, espiga de 0.08 m. de largo, grano sin vitrosidad y peso de 100 granos es igual a 30 gramos (10,12).

3.11.4 Comalapa: Variedad adaptada a alturas entre 1,525 y 1,980 msnm. La altura de planta como promedio es de 0.75 m. Alcanza su madurez fisiológica a los 125 días después de la siembra, variedad de madurez media. La cosecha se realiza a los 140 días su peso específico es 73 kilogramos por hectolitro (7.3 gr/cc). Su rendimiento oscila entre 2.75-3.25 toneladas por hectáreas (9).

3.11.5 Patzún: Variedad que se cultiva entre los 1525 y 1980 msnm. y temperaturas que oscilan entre 18 y 24 °C. Alcanza alturas de 0.85 a 0.95 m. desde la base del tallo al extremo distal de la espiga. Alcanza su madurez fisiológica a los 120-125 días, considerada como variedad de madurez intermedia, Peso específico del grano de 74 kilogramos por hectolitro (7.4 gr/cc).

Su rendimiento oscila entre 3.5-4.5 toneladas por hectárea (11,12).

3.11.6 Santa Ana: Variedad de trigo semi-suave, con rendimiento promedio de 3.95 toneladas por hectárea; 65 días a la floración, 122 días a la madurez fisiológica, variedad de madurez media, con 185 días a la cosecha. Su peso específico en la semilla es de 7 kilogramos por hectolitro (7.6 gr/cc). La planta presenta las siguientes características: altura de 1 a 1.06 m. tamaño de la espiga de 8 cm, 4 granos por espiguilla, 16 espiguillas por espiga, grano blanco, tipo de grano bueno, desgrane de 0% y amacollo regular (10).

3.11.7 Zaragoza: Variedad de trigo semi-suave, adaptada a alturas que van desde los 1,525 a 1,980 msnm. variedad precoz, grano de color rojo. Altura de planta de 0.85 m. Alcanza su madurez fisiológica al corte con la hoz a los 115 días y con la combinada a los 140 días. No se desgrana en el campo y no le afectan las enfermedades de tallo y de las hojas. Tiene un rendimiento promedio de 3.43 toneladas por hectárea (13,14).

3. OBJETIVOS

1. Evaluar la respuesta de siete variedades de trigo (Triticum aestivum L.) a la inducción de callo, in vitro utilizando embriones inmaduros provenientes de plantas cuya semilla que le dió origen es irradiada con rayos Gamma (Cesio 137).
2. Evaluar al respuesta de siete variedades de trigo (Triticum aestivum L.) a la inducción de brotes apicales, utilizando callos provenientes de embriones inmaduros producidos por plantas cuya semilla que le dió origen fue irradiada con rayos Gamma (Cesio 137).
3. Evaluar el efecto de la irradiación Gamma (Cesio 137), en la respuesta a la inducción de callo y brotes apicales, utilizando embriones inmaduros de siete variedades de trigo provenientes de plantas cuya semilla que le dió origen ha sido irradiada.

4. HIPOTESIS

1. Evaluar la respuesta de siete variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.) a la inducción de callos, utilizando embriones inmaduros provenientes de plantas cuya semilla de embriones inmaduros, provenientes de plantas cuya semilla de origen es irradiada con rayos Gamma (Caso 177).

 - Las siete variedades de trigo a evaluar forman callo a partir de embriones inmaduros, provenientes de plantas cuya semilla que las origina, es irradiada con rayos Gamma.

2. Evaluar la respuesta de siete variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.) a la inducción de brotes apicales, utilizando embriones inmaduros producidos por plantas cuya semilla que le dio origen fue irradiada con rayos Gamma (Caso 177).

 - Las siete variedades de trigo a evaluar, inducen brotes apicales a partir de callos que provienen de embriones inmaduros de plantas cuya semilla que las origina, es irradiada con rayos Gamma.

3. Evaluar el efecto de la irradiación Gamma (Caso 177), en la respuesta a la inducción de callos y brotes apicales, utilizando embriones inmaduros de siete variedades de trigo provenientes de plantas cuya semilla que le dio origen ha sido irradiada.

 - Existe una dosis de radiación que induce mayor formación de callos, independientemente a la variedad de trigo.

5. METODOLOGIA

1. Desarrollo de la Investigación

1.1 Etapas

a) Obtención de semilla

La selección de las variedades se llevo a cabo tomando en cuenta la distribución de las mismas, el grado de importancia en la siembra de los tricultores, y algunas características propias de cada una como, resitencia o tolerancia a enfermedades o plagas, porte, tamaño de espiga, rendimiento, adaptabilidad y ciclo de cultivo.

La semilla se obtuvo en el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola (ICTA), de los lotes de semilla certificada existente. En el ICTA de Chimaltenango se obtuvo semilla de las variedades Comalapa, Balán, Santa Ana, Zaragoza y Patzún. En el ICTA de Quetzaltenango, la variedad Xequijel y Chocoyo.

b) Desarrollo de un Protocolo para Inducción de Callo y Brotes Apicales.

Para poder observar el efecto de irradiación sobre la inducción de callo y regeneración de brotes fue necesario establecer primero un procedimiento por medio del cual, las variedades formarían callo y regeneraran brotes. Por lo que se hicieron varios ensayos en blanco, utilizando como base el protocolo de Sharma & Gill, al cual se le hizo una modificación agregándole 1 mg/l de BAP, en la fase tres, logrando que los embriones inmaduros obtenidos de las plantas producidas

con la semilla de las siete variedades, formaran callo y regeneraran brotes apicales.

El protocolo de Sharma & Gill modificado consiste en cuatro fases siendo estas:

Inducción de Callo, en esta fase se utilizan los embriones inmaduros del material a evaluar, sembrándose en un medio de cultivo constituido por MS más 2 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de Kinetina. El tiempo de cultivo es de cuatro semanas y sus condiciones externas son de 26 grados centígrados en la obscuridad .

Crecimiento de Callo, Se utiliza como medio basal MS, agregándole 1 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de Kinetina, en este medio se transfieren aquellos callos que se forman de la fase anterior. Las condiciones de cultivo son de 26 °C a temperatura constante y obscuridad , durante cuatro semanas.

Inducción de brotes, los callos que crecen en la fase anterior, se transfieren a un medio MS, con adición de 0.5 mg/l de 2,4-D , 0.5 mg/l de Kinetina y 1 mg/l de BAP. Los macronutrientes en el medio se reducen el 50%. Las condiciones de incubación son de 12 horas luz y temperatura de 25 °C, durante cuatro semanas.

Inducción de raíces, los brotes apicales obtenidos en la etapa anterior se transfieren a un medio MS, suplementado con 0.5 mg/l de Kinetina, en el medio basal se reduce a un 50 % los macronutrientes, en condiciones de cultivo de 25 °C y 12

horas luz, durante cuatro semanas.

c) Irradiación de semilla

El material obtenido se preparó en lotes de 100 g, embalados e identificados en bolsas de papel. Se utilizaron dosis de

irradiación, con rayos Gamma (Cesio 137), las cuales fueron seleccionadas en base a ensayos en blanco realizados

previamente. Dichas dosis fueron: 5, 10, 15, 20 y 25 kilogramos por variedad.

Esta actividad se realizó en el laboratorio de MOSCAMED, ubicado en San Miguel Petapa, utilizando para ello un irradiador autoblandado marca HUSSMAN, con almacenamiento en seco.

c) Etapa de campo

c.1 Siembra de la semilla:

Se realizaron 3 siembras con una semana de intervalo cada una, para así poder contar con material adecuado con un rango de tiempo más amplio. Se hicieron parcelas de 4 m² sembrando a "chorrillo" con distanciamiento de 0.5 m entre surco. En cada parcela había sembrada una variedad, en cada surco, una dosis de irradiación.

c.2 Control de plagas, enfermedades y malezas, fertilización y

protección contra pájaros: Las principales plagas encontradas fueron: Tortuguillitas (Epilahsna sp.), Homópteros,

algunas chinches, para lo cual fue aplicado cada 10 días

Folidol a razón de 100 cc/bomba de 4 gln. Dentro de las

enfermedades sólo se encontró roya (Puccinia tritici), prin-

cipalmente en la variedad Chocoyo, siendo la incidencia me-

nor en las otras variedades, para esto se aplicó conjuntamente con Folidol, Dithane a razón de 50 cc/bomba de 4 gln. La fertilización se hizo al momento de la siembra, aplicando triple quince a razón de 8 quintales por manzana, colocado en banda lateral.

El control de maleza se hizo en forma manual haciendo en total tres limpieas con espacio de 15 días cada una.

Para controlar a los pájaros fue necesario colocar después de la siembra un sarán de 60 % de luz, sobre los surcos sembrados evitando así que fuera sacada la semilla. Este sarán se quitó 15 días después de la siembra, volviéndose a colocar en el momento del espiguelo (40 días después de la siembra), colocándose sobre tubos formando un invernadero a media luna.

c.3 Marcación:

Se marcaron 12 espigas por tratamiento, cuando éstas presentaron un 20% de anteras recién salidas, las cuales mostraban color amarillo intenso, a 2 cm del pedúnculo, desde la hoja bandera hasta la primera espiguilla.

c.4 Cosecha de espigas:

Veinte días después de la marcación, se procedió a recolectar las espigas marcadas. Dicha recolección se hizo por la mañana, para obtener de ellas las semillas y embriones inmaduros.

d) Etapa de Laboratorio

d.1 Desgrane de espigas:

Cuidadosamente se eliminaron glumas y lenmas, dejando

completamente desnudo el grano.

d.2 Preparación de medios de cultivo:

La preparación de medios se hizo de acuerdo al protocolo de multiplicación in vitro para embriones inmaduros de Sharma & Gill modificado. Este protocolo posee como base un medio de Murashige Skoog, cuyos componentes se muestran en el cuadro 4, Las soluciones madre se preparan a distintas concentraciones: A 10X los macronutrientes, 100X los micronutrientes y solución de hierro, a 1,000 X se preparan las soluciones de vitaminas-HCl, a 100X el Mioinositol, agregándose sucrosa a un 3%, agar al 0.6 %.

Los reguladores empleados fueron 2,4-D presentación en polvo diluido en etanol al 70%, Kinetina, presentación en cristales diluida en etanol y la Bencil-amino-purina, la cual se utilizó ya diluida en agua. El orden de preparación del medio fue: Inicialmente se aforó un erlenmeyer de 1,000 ml hasta 300 ml con agua desmineralizada y tridestilada. Esta fue colocada en una estufa de agitación llevándola a temperatura normal (25 °C), con agitación constante se le adicionó en el orden siguiente: Sucrosa, Macro Nutrientes, Micro Nutrientes, solución de hierro, mioinositol, vitaminas, reguladores, y se aforó hasta 1,000 ml. Luego, se adicionó el agar para luego calentarlo y llenar frascos.

d.3 Desinfección de semilla:

Para ésto se utilizó hipoclorito de sodio al 0.525%, sumergiendo las semillas durante 15 minutos con agitación continua, luego se aplicaron dos lavados con agua destilada y

desmineralizada, esterilizada.

d.4 Extracción y siembra de embriones:

En la cámara de flujo laminar, con toda la técnica de asepsia

Cuadro 4 Composición del medio de cultivo basal Murashige y Skoog (MS) a usarse en la inducción de callos y brotes apicales*.

COMPONENTES	CONCENTRACION mg/l
NH_4NO_3	1,650.000
KNO_3	1,900.000
KH_2PO_4	170.000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.000
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.800
Na_2EDTA	37.300
H_3BO_3	6.200
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.300
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10.600
KI	0.830
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250
$\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
VITAMINA-HCL	0.100
ACIDO NICOTINICO	0.500
MIOINISITOL	100.000
GLICINA	2.000

*Tomado de Hurtado M., D.V y Merino M., M.E.
Cultivo de Tejidos Vegetales, 1,962.

cia (uso de mascarilla, flameado de instrumentos, autoclaveado de cristalería y desinfección de manos con alcohol etílico al 60%), se procedió a extraer los embriones de las semillas. La extracción de los embriones se realizó haciendo una escisión en la parte dorsodistal del grano, luego haciendo presión lateral se estirpa el embrión. Luego se fueron colocando cada uno de éstos en grupos de diez por frasco que contenía el medio. Los explantes fueron colocados en la superficie del medio no importando la posición, ya que la bibliografía recomendaba un contacto directo entre el embrión y el medio, por lo que se hizo un ensayo en blanco cuyos resultados indicaron que lo importante es no sumergir el explante. Los frascos fueron colocados en una incubadora a 25 °C y obscuridad completa, por un período de 4 semanas. En esta fase se identificaron los diferentes tratamientos evaluados, los cuales fueron: Balán, Comalapa, Zaragoza, Xequijel, Santa Ana, Patzún, Chocoyo con sus respectivas dosis de irradiación 0, 5, 10 15 20 y 25 kilorads, completando en total 42 tratamientos, constituyendo cada tratamiento 10 frascos con diez embriones cada uno.

d.5 Transferencia de callos embriogénicos al medio de crecimiento:

En la cámara de flujo laminar, con toda la técnica de asepsia mencionada anteriormente, se transfirieron los callos obtenidos de la etapa anterior, a los frascos de compota, y se colocaron en incubadora a 25 °C y en obscuridad, durante un período de 4 semanas.

d.6 Transferencia de callos embriogénicos crecidos al medio de inducción y desarrollo de brotes apicales:

En la cámara de flujo laminar, con toda la técnica de asepsia mencionada anteriormente, se transfirieron los callos obtenidos de la etapa anterior, a frascos de compota, colocándolos en la estantería con 12 horas luz por cuatro semanas con una temperatura de 25 grados centígrados.

4. Evaluación de la Investigación

4.1 Variables evaluadas:

- ETAPA DE INDUCCION DE CALLOS

En la fase de inducción de callo, se calculó:

a. Porcentaje de callos formados utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de callos formados por tratamiento} = \frac{\# \text{ embriones con callo}}{\# \text{ embriones sembrados}} \times 100$$

Callo formado es aquel, que ha formado una masa amorfa periférica al embrión en la mayoría de los casos.

b. Número de callos cremosos

$$\text{Número de callos cremosos por tratamiento} = \text{sumatoria callos cremosos}$$

Callo cremoso se toma a aquellos callos cuya coloración es un poco más opaca que el callo cristalino.

c. Número de callos crecidos:

$$\text{Número de callos crecidos por tratamiento} = \text{sumatoria de callos crecidos}$$

Cuando se forma el callo este presenta un tamaño pequeño más o menos de 2 o 3 milímetros de diámetro, callo crecido es aquel que sobrepase este diámetro.

d. Porcentaje de callos friables:

$$\text{Porcentaje de callos friables por tratamiento} = \frac{\text{\#callos friables}}{\text{\#callos crecidos}} \times 100$$

La consistencia de un callo friable es de apariencia de esponja, en contra posición el compacto es sólido.

- ETAPA DE INDUCCION DE BROTES APICALES

e. Número de puntos verdes:

$$\text{Número de puntos verdes} = \frac{\text{Promedio de puntos verdes del callo con mayor y menor número de p. verdes}}{\text{Número de callos}}$$

En algunos tejidos de plantas es difícil tomar esta variable. En trigo se hace un estimado ya que los puntos muchas veces forman manchas verdes porque están muy unidos. En las fases iniciales es más fácil determinar el número de puntos verdes como promedio, para lo cual se toma la lectura del callo que presente mayor y menor cantidad de puntos verdes para sacar un promedio.

f. Porcentaje de Brotes Inducidos:

$$\text{Porcentaje de brotes Inducidos por tratamiento} = \frac{\text{número de Brotes}}{\text{número de embriones sembrados}} \times 100$$

Brote apical es cuando el punto verde se ha desarrollado por lo menos un milímetro.

g. Relación brote Inducido por puntos verdes:

$$\text{Rel B. Ind./pto.verde} = \frac{\text{\# de brotes}}{\text{\# pts.verd.}}$$

h. Relación brote Inducido por callo

formado:

$$\text{Relación Brote Inducido por callo por tratamiento} = \frac{\text{Número de Brotes}}{\text{Número de Callos}}$$

4.2 ANALISIS DE LA INFORMACION:

El análisis se realizó en forma descriptiva, tomando como base del razonamiento estadísticos como la media y el porcentaje para cada una de las variables mencionadas: porcentaje de callos inducidos, porcentaje de embriones fenolizados, número de callos cremosos, número de callos cristalinos, número de callos fenolizados, número de callos crecidos, porcentaje de callos friables, porcentaje de brotes apicales inducidos, relación brote inducido por embrión, relación brote inducido por punto verde, relación brote inducido por callo (descritos en el literal 4.1).

f. Porcentaje de Brotes Inducidos:

$$\text{Porcentaje de Brotes Inducidos} = \frac{\text{número de Brotes}}{\text{número de embriones} \times 100}$$

Brote apical es cuando el punto verde se ha desarrollado por lo menos un milímetro.

g. Relación brote Inducido por puntos verdes:

$$\text{Rel. B. Ind. / Pto. Verde} = \frac{\# \text{ de Brotes}}{\# \text{ Pto. Verd.}}$$

6. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

6.1. Respuesta de las Variedades:

6.1.1 Inducción de Callo

Como puede observarse en el cuadro 5 y 8 (pag.37 y 41) y figura 1 (en pag 42), las variedades se comportaron con un patrón muy similar para cada variable, en tal sentido encontramos que:

Las siete variedades evaluadas responden bien a la formación de callo. Se encontraron valores porcentuales en un rango de 94-100%, observándose que las variedades Comalapa, Santa Ana, Xequijel y Zaragoza respondieron con un valor del 100%; la variedad Chocoyo presentó el valor porcentual más bajo siendo éste un 94% (ver figura 2 del anexo).

La característica de friabilidad observada en los callos formados por las siete variedades presentaron un valor del 100%, a excepción de la variedad Chocoyo que presentó el valor más bajo siendo este del 98%. Como puede observarse, a pesar de ser el más bajo se encuentra en una categoría muy similar a la respuesta del resto de variedades. (fig 3 del anexo)

6.1.2 Inducción de Brotes Apicales

El porcentaje de brotes apicales mostrado por las variedades oscila en un rango de 50-69 unidades. Como podemos ver, las siete variedades poseen capacidad de inducción de brotes. La variedad Patzún mostró mayor capacidad de brotación habiéndose observado en promedio 60 brotes apicales por cada 100 embriones

mientras la variedad Comalapa presentó el valor más bajo en la inducción de brotes (50 brotes apicales/100 embriones.), el resto de variedades se mantuvieron en valores muy cercanos a la media la cual fue de 59 brotes apicales/100 embriones tratados. Para poder apreciar de una forma cuantitativa, el grado de inducción de brotes apicales de las variedades, se calculó la relación porcentual entre brotes inducidos por callo formado, encontrándose un rango entre 50- 72% , cuyo valor más alto corresponde a la variedad Patzún y el más bajo para la variedad Comalapa. Si nos damos cuenta, este resultado concuerda con los resultados obtenidos en cuanto a inducción de brotes. (fig 7 del anexo).

CUADRO 5 Resumen de resultados para las diferentes fases realizadas, tomando los datos de los testigos

TRATAMIENTO	% C A L. (1)	% F R I A B L E (2)	% C R E C I D O (3)	X P. V E. (4)	REL.% B R O T E S (5)	% B R O T E S (6)
OK Balán	98	100	98	8	60	59
OK Comalapa	100	100	100	9	50	50
OK Chocoyo	94	98	94	8	58	55
OK Patzún	98	100	96	10	72	69
OK Santa Ana	100	100	100	9	60	60
OK Xequijel	100	100	100	14	60	60
OK Zaragoza	100	100	100	12	60	60

- (1)= Porcentaje de Callos Inducidos
- (2)= Porcentaje de Callo Friable
- (3)= Porcentaje de Callo Crecido
- (4)= Media de Puntos verdes por Callo
- (5)= Relación Porcentual entre Brotes Inducidos y Callos.
- (6)= Porcentaje de Brotes Apicales Inducidos

La cantidad media de puntos verdes encontrados en las siete variedades mostraron un compartamiento en valores más bajos y más altos entre 8 y 14 puntos verdes por callo, sin embargo los valores más altos no corresponden a las variedades que formaron mayor cantidad de brotes. Por otro lado, la cantidad de puntos verdes de las variedades Balán, Xequijel, Santa Ana y Zaragoza (8, 9, 14 y 12 respectivamente), no afectan la cantidad de brotes formados por estas variedades (60 para todas).

Por lo anterior, se deduce que no existe alguna relación entre la cantidad de puntos verdes y la capacidad de inducción de brotes apicales de las diferentes variedades evaluadas.

Para poder hacer una presentación y un análisis bastante descriptivo, se presentan los resultados en el cuadro 5 en forma de resumen tomando las principales variables.

6.2 Efecto de Radiación Gamma

Para poder interpretar los resultados obtenidos, se presenta en los cuadros 6, 7, 8 (pag. 39, 40, 41), un resumen de las principales variables analizadas, pudiendo observar que el comportamiento de los resultados atiende principalmente al efecto producido por la dosis de irradiación, y en menor grado al efecto de la variedad, ya que si observamos los resultados de los cuadros 10, 11 y 12 graficados en las figuras 2, 3, 4, 5, 6 y 7 del anexo en donde aparecen los resultados generales, se determina un patrón muy similar en cada variedad. Además puede observarse el patrón de comportamiento en la figura número 2, 3, 4 y 5 del anexo.

6.2.1 Inducción de Callo

-La formación de callo osciló en un rango de 58 y 100 %, correspondiendo los valores más bajos a las irradiaciones más altas, es decir a 20 y 25 kilorads. En el cuadro cinco se presenta un resumen de medias por dosis, pudiéndose clasificar por categorías alta (tendientes al 100%) dosis de 5, 0, 10 y 15 kilorads, media (tendientes a la media general 89), la dosis de 20 kilorads, y por último la categoría baja cuyo valor tiende a alejarse, haciéndose más pequeño que la media general, la dosis de 25 kilorads (ver figuras 2 y 4 del anexo).

De manera general, podemos apreciar que la irradiación tiene un efecto negativo sobre la formación de callo siendo más marcado este efecto, cuanto más alta es la dosis de irradiación.

La característica de coloración de los callos producidos, puede ser un indicativo sobre la friabilidad esperada del callo, ya que en base a ésta podemos determinar la cantidad de callos friables que pasarán a la siguiente etapa. En el cuadro siete podemos apreciar que las medias se comportan de igual forma que para la variable callos formados, variando en que en la categoría media estaría la dosis de 15 kilorads, y en la baja los tratamientos de 20 y 25 kilorads.

Cuadro 6: Resumen de medias de las diferentes variables, correspondientes a las dosis de radiación de la fase uno.

Variable Tratamiento	Media de % callos formados	Media de % callos cremosos
0 Kilorads	99	99
5 Kilorads	100	100
10 Kilorads	96	90
15 Kilorads	95	77
20 Kilorads	86	55
25 Kilorads	64	40

-En la etapa de crecimiento de los callos formados, las principales variables: callos crecidos y porcentaje de friabilidad de éstos, nos indican que los mejores resultados según cuadro 6, se encuentran en las dosis de 0 y 5 kilorads

Cuadro 7: Resumen de medias de las diferentes variables consideradas en la fase dos para las distintas dosis de radiación

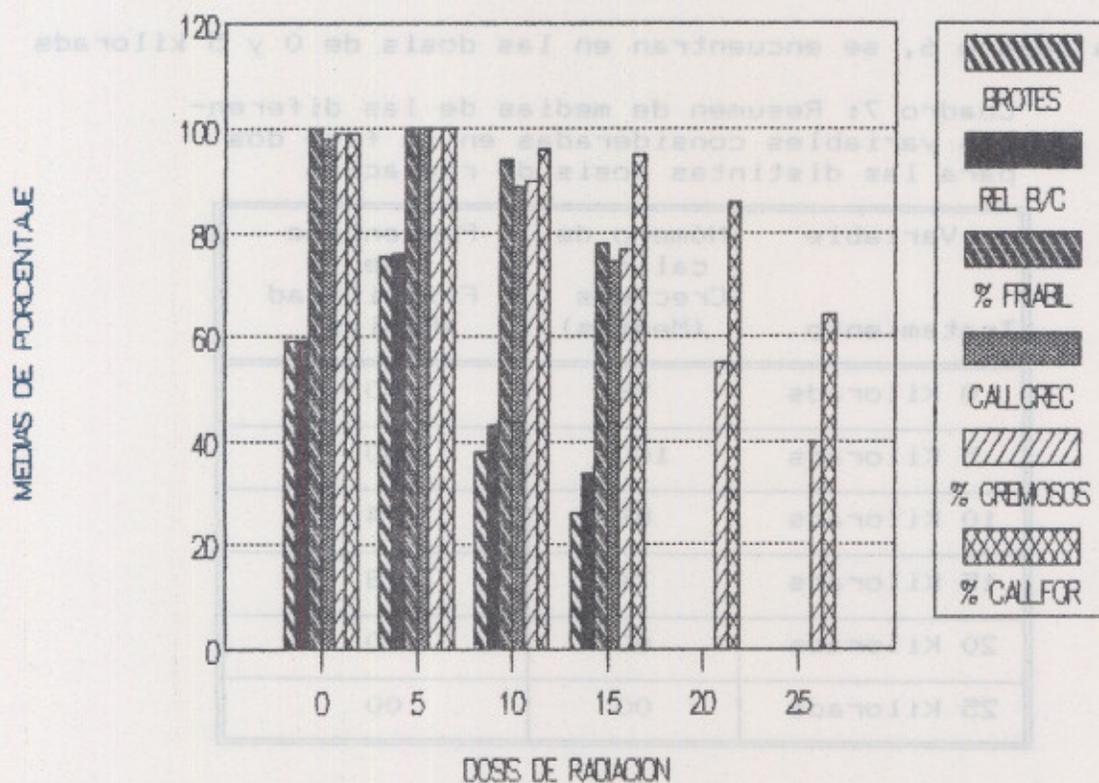
Variable Tratamiento	Número de callos Crecidos (Medias)	Porcentaje de Friabilidad (Medias)
0 Kilorads	98	100
5 Kilorads	100	100
10 Kilorads	89	94
15 Kilorads	74	78
20 Kilorads	00	00
25 Kilorads	00	00

mientras las dosis de 10 y 15 kilorads presentan buenos resultados aunque sean más bajos comparativamente con el resto.

En las dosis de 20 y 25 kilorads se presentan resultados bastante claros, lo que nos indica que estas dosis de irradiación son letales para el material evaluado.

Tratamiento	% Callos formados	% Callos cremosos
0 Kilorads	99	99
5 Kilorads	100	100
10 Kilorads	95	90
15 Kilorads	92	77
20 Kilorads	86	52

RESUMEN DE RESULTADOS EXPRESADOS EN MEDIAS DE PORCENTAJE



CUADRO 8 Resumen de resultados de las distintas fases

Variable	% C A L.	% F R I L.	% C A C	X P. V e.	REL.% B / C	% B r o
Tratam.	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
OK Balán	98		98	8	60	59
5K Balán	100	100	100	9	70	70
10K Balán	90	86	85	8	46	39
15K Balán	96	74	70	7	30	21
20K Balán	90	46	0	0	0	0
25K Balán	58	0	0	0	0	0
OK Comalapa	100	100	100	9	50	50
5K Comalapa	100	100	100	12	70	70
10K Comalapa	100	90	100	6	36	36
15K Comalapa	92	86	81	3	30	24
20K Comalapa	88	72	0	0	0	0
25K Comalapa	70	0	0	0	0	0
OK Chocoyo	94	98	94	8	58	55
5K Chocoyo	100	100	100	8	70	70
10K Chocoyo	100	100	92	6	43	40
15K Chocoyo	88	90	78	3	31	24
20K Chocoyo	100	74	0	0	0	0
25K Chocoyo	64	0	0	0	0	0
OK Patzún	98		96	10	72	69
5K Patzún	100	100	100	11	90	90
10K Patzún	98	98	98	5	39	38
15K Patzún	96	82	92	5	35	32
20K Patzún	90	74	0	0	0	0
25K Patzún	62	0	0	0	0	0
OK Santa Ana	100	100	100	9	60	60
5K Santa Ana	100	100	100	9	60	60
10K Santa Ana	90	80	90	3	32	29
15K Santa Ana	98	76	53	3	42	22
20K Santa Ana	92	72	0	0	0	0
25K Santa Ana	62	0	0	0	0	0
OK Xequijel	100	100	100	14	60	60
5K Xequijel	100	100	100	16	80	80
10K Xequijel	100	96	70	10	54	38
15K Xequijel	92	88	53	7	60	32
20K Xequijel	90	66	0	0	0	0
25K Xequijel	62	0	0	0	0	0
OK Zaragoza	100	100	100	12	60	60
5K Zaragoza	100	100	100	16	80	100
10K Zaragoza	92	84	92	7	46	92
15K Zaragoza	100	70	89	5	28	89
20K Zaragoza	70	66	0	0	0	0
25K Zaragoza	72	0	0	0	0	0

- (1)= Porcentaje de Callos Inducidos
- (2)= Porcentaje de Callo Friable
- (3)= Porcentaje de Callo Crecido
- (4)= Media de Puntos Verdes por Callo
- (5)= Relación Porcentual entre Brotes Inducidos y Callos.
- (6)= Porcentaje de Brotes Apicales Inducidos

6.2.2 Inducción de Brotes Apicales

- La fase de inducción de brotes apicales dió como resultados los expresados en términos medios del cuadro 9, de los cuales podemos observar que el comportamiento de la dosis de 5 kilorads fue mejor que el resto de dosis, tanto en cantidad de brotes inducidos, como también el porcentaje de eficiencia en cuanto a brotes inducidos por callos formados. En segundo lugar, encontramos a 0 kilorads, existiendo una diferencia entre el primero y éste de 16 unidades en cuanto a brotes apicales, mientras la eficiencia difiere en 17 unidades porcentuales, como términos medios generales. Las dosis de 10 y 15 presentaron resultados mucho más bajos que las dosis de 5 y 0 kilorads.

Cuadro 9 Resumen de medias de los datos obtenidos en la fase tres, correspondiente a radiación.

Variable Tratamiento	Media de Brotes Inducidos (unidades)	Media de la Relación entre Brotes/callos (porcentaje)
0 Kilorads	59	59
5 Kilorads	75	76
10 Kilorads	38	43
15 Kilorads	26	34
20 Kilorads	00	00
25 Kilorads	00	00

7. CONCLUSIONES

1. Las variedades de trigo Balán, Comalapa, Chocoyo, Patzún, Santa Ana, Xequijel y Zaragoza tienden a responder a la inducción de callo y brotes a través del cultivo in vitro de embriones inmaduros, en el medio de Sharma & Gill modificado.
2. Las dosis de radiación , mostraron un efecto sobre la inducción y crecimiento de callo inducción de brotes apicales. Este efecto se observa en la presente investigación pudiendo ser diferentes en otros estudios similares que se hagan, ya que las mutaciones son eventos al azar.
3. A dosis mayores de 20 kilorads la tendencia a la inducción de callo es baja en las siete variedades evaluadas y el callo inducido mostró un desarrollo nulo.

8. RECOMENDACIONES

- 1.- Realizar investigaciones utilizando el protocolo de Sharma & Gill modificado, con las variedades de trigo, Patzún, Comalapa, Xequijel, Santa Ana, Zaragoza, Balán y Chocoyo, llevándolas hasta la fase de regeneración de plantas.
- 2.- Puede utilizarse la radiación , para estimular la formación y crecimiento de callos friables, y brotes apicales, en la multiplicación in vitro, a través de embriones inmaduros de las variedades evaluadas.
- 3.- No utilizar dosis mayores de 20 kilorads en reproducción de trigo por vía in vitro, a través de embriones inmaduros .

9. BIBLIOGRAFIA

1. AHLQOWALIA, B.S. 1982. Plant regeneration from callus culture in wheat. *Crop Science (EE.UU)* 22(34):405-410.
2. ALVARADO GOMEZ, J. 1992. Evaluación de medios de cultivo para la inducción de callo y regeneración de plantas en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), variedad Quinack Che. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 71 p.
3. ARISUMI, T. 1980. In vitro culture of embryos and ovules of certain incompatible selfs and crosses among *Impatiens* species. *J. Am. Soc. HortScience. (EE.UU)* 105:629-631.
4. BAJAJ, Y.P.S. 1980. Enhancement of the in vitro development of *Triticale* embryos by the endosperm of Durum wheat. *Cereal Res. Commun.* 8:359-364.
5. BHOJWANI, S.S. ; RAZDAN, M.K. 1983. Zygotic embryo culture. *Plant Tissue Culture (Bélgica)* 23(12):199-235
6. CALDERON DIAZ, J.H. 1990. Evaluación de la respuesta de cinco variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.), a la inducción de callo y regeneración de plantas en diferentes medios de cultivo, a partir de cultivo de anteras. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 54 p.
7. CRUZ S., J.R. DE LA. 1982. Clasificación de zonas de vida de Guatemala, a nivel de reconocimiento. Guatemala, Instituto Nacional Forestal. 42 p.
8. ESTADOS UNIDOS. DEPARTAMENTO DE DEFENSA. s.f. Guatemala, city maps. Washington, E.E.U.U Esc. 1:12,500,000. Color.
9. GUATEMALA. INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA AGRICOLA. 1979. El cultivo de trigo en la región I. Guatemala ICTA. Folleto Técnico no. 8. 16 p.
10. -----, 1984. Nuevas variedades de trigo para el altiplano Central. Guatemala s.p.
11. -----, 1986. Programa nacional de trigo. Guatemala. 62 p.
12. -----, 1987. Informe técnico programa nacional de trigo. Región I. Guatemala. 55 p.

13. -----, 1988. Programa de trigo Chimaltenengo. Guatemala, ICTA. Informe Técnico no.22. p.51-54.
14. -----, 1991. Nuevas variedades de trigo para el altiplano central de Guatemala. Guatemala. s.p.
15. HU, C.; WANG, P. 1986. Meristem, shoot tip, and bud culture. Handbook of plant (Japón) 1(43):38-41.
16. HURTADO, M.D.V. ; MERINO, M.E. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. México, D.F., Trillas. 232 p.
17. MacKINNON, C. 1987. High efficiency plant regeneration by somatic embryogenesis from callus of mature embryo explants of bread wheat (*Triticum aestivum*) and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). In vitro Cellular & Developmental Biology. (EE.UU) 23(6):443-448.
18. MONNIER, M. 1978. Culture of zygotic embryos. Frontiers of Plant Tissue Culture. (EE.UU) 7(16):286.
19. NAVARRO ALVAREZ, W. 1988. Mutagénesis mediante técnicas in vitro. México, s.n. p.54-105.
20. NITSCH, C. ; NORREEL, B. 1972. Factors favoring the formation of androgenetic embryos in anther culture en genes. Enzymes and Populations. (EE.UU) 2:128-144.
21. NORSTOG, K. 1974. Embryo culture as a tool in the study of comparative and development morphology. Physiology Plant. (EE.UU) 30:240-245.
22. SIMMONS, C.S.; TARAND, J.M.; PINTO, J.H. 1959. Clasificación a nivel de reconocimiento de los suelos de la República de Guatemala. Trad. por Pedro Tirado Sulzona. Guatemala, Ed. José de Pineda Ibarra. 1,000 p.
23. SCHILDE, L.; SCHIMIEDICHE, P. 1984. El cultivo de tejidos, su pasado, presente y futuro. Lima, Perú. CIP. Circular no. 11. 7 p.
24. THORPE, T.A. 1981. Plant tissue culture; methods and applications in agriculture. EE.UU., Academic Press. 379 p.
25. VILLALOBOS, V.M. 1986. Fundamentos técnico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Chapingo, México, Colegio de Postgraduados, Centro de Genética, Lab. de Biotecnología. 192 p.

V. Bo. Quiam de la Roca



Cuadro 10. Índices por tratamiento de los resultados obtenidos en la primera fase.

NUMERO	TRATAMIENTO	EXPOSICION DENSIDAD	CALOR FORMADO	FIBRIN FORMADO	NUMERO DE CALOR POR COLOR CRISTALINO
1	0K Balsa	100	70	2	0
2	2K Balsa	100	100	0	0
3	10K Balsa	100	70	10	0
4	12K Balsa	100	70	4	0
5	20K Balsa	100	70	10	47
6	25K Balsa	100	20	42	46
7	0K Coacidos	100	100	0	0
8	2K Coacidos	100	100	0	0
9	10K Coacidos	100	100	0	0
10	12K Coacidos	100	92	0	11
11	20K Coacidos	100	80	12	40
12	25K Coacidos	100	70	20	2
13	0K Chocoyos	100	94	0	0
14	2K Chocoyos	100	100	0	0
15	10K Chocoyos	100	100	0	0
16	12K Chocoyos	100	80	12	10
17	20K Chocoyos	100	100	0	40
18	25K Chocoyos	100	100	0	17
10. ANEXO					
19	0K Falsa	100	70	2	2
20	2K Falsa	100	100	0	0
21	10K Falsa	100	90	2	0
22	12K Falsa	100	70	4	4
23	20K Falsa	100	70	10	24
24	25K Falsa	100	42	20	22
25	0K Salsa Ana	100	100	0	0
26	2K Salsa Ana	100	100	0	0
27	10K Salsa Ana	100	70	10	0
28	12K Salsa Ana	100	70	2	40
29	20K Salsa Ana	100	72	0	7
30	25K Salsa Ana	100	72	20	22
31	0K Tapat Jal	100	100	0	0
32	2K Tapat Jal	100	100	0	0
33	10K Tapat Jal	100	100	0	20
34	12K Tapat Jal	100	92	0	24
35	20K Tapat Jal	100	70	10	22
36	25K Tapat Jal	100	92	20	0
37	0K Lavapasa	100	100	0	0
38	2K Lavapasa	100	100	0	0
39	10K Lavapasa	100	92	0	0
40	12K Lavapasa	100	100	0	11
41	20K Lavapasa	100	70	20	22
42	25K Lavapasa	100	72	20	0

Cuadro 10. Medias por tratamiento de los resultados obtenidos en la primera fase.

NUMERO	TRATAMIENTO	EMBRIONES SEMBRADOS	CALLOS FORMADOS	EMBRION FENOLIZADO	NUMUNERO DE CALLOS POR COLOR	
					CREMOSOS	CRISTALINOS
1	0K Balan	100	98	2	98	0
2	5K Balan	100	100	0	100	0
3	10K Balan	100	90	10	85	5
4	15K Balan	100	96	4	96	0
5	20K Balan	100	90	10	43	47
6	25K Balan	100	58	42	12	46
7	0K Comalapa	100	100	0	100	0
8	5K Comalapa	100	100	0	100	0
9	10K Comalapa	100	100	0	100	0
10	15K Comalapa	100	92	8	81	11
11	20K Comalapa	100	88	12	48	40
12	25K Comalapa	100	70	30	68	2
13	0K Chocoyo	100	94	6	100	0
14	5K Chocoyo	100	100	0	100	0
15	10K Chocoyo	100	100	0	92	8
16	15K Chocoyo	100	88	12	78	10
17	20K Chocoyo	100	100	0	52	48
18	25K Chocoyo	100	64	36	47	17
19	0K Patzún	100	98	2	96	2
20	5K Patzún	100	100	0	100	0
21	10K Patzún	100	98	2	98	0
22	15K Patzún	100	96	4	92	4
23	20K Patzún	100	90	10	56	34
24	25K Patzún	100	62	38	0	62
25	0K Santa Ana	100	100	0	100	0
26	5K Santa Ana	100	100	0	100	0
27	10K Santa Ana	100	90	10	90	0
28	15K Santa Ana	100	98	2	53	45
29	20K Santa Ana	100	92	8	85	7
30	25K Santa Ana	100	62	38	37	25
31	0K Xequijel	100	100	0	100	0
32	5K Xequijel	100	100	0	100	0
33	10K Xequijel	100	100	0	70	30
34	15K Xequijel	100	92	8	53	39
35	20K Xequijel	100	90	10	55	35
36	25K Xequijel	100	62	38	53	9
37	0K Zaragoza	100	100	0	100	0
38	5K Zaragoza	100	100	0	100	0
39	10K Zaragoza	100	92	8	92	0
40	15K Zaragoza	100	100	0	89	11
41	20K Zaragoza	100	70	30	48	22
42	25K Zaragoza	100	72	28	66	6

Cuadro 11 Medias por tratamiento de los resultados obtenidos en la fase dos.

NUMERO	TRATAMIENTO	CALLOS SEMBRADOS	CALLO FENOLIZADO	PORCENTAJE DE CALLOS	CALLOS CRECIDOS	PORCENTAJE DE CALLOS FRIABLES - COMPACTOS	
1	0K Balan	98	00	98	98	100	00
2	5K Balan	100	00	100	100	100	00
3	10K Balan	90	00	90	85	85	05
4	15K Balan	96	00	96	70	73	27
5	20K Balan	90	90	90	00	00	100
6	25K Balan	58	58	58	00	00	100
7	0K Conalapa	100	00	100	100	100	00
8	5K Conalapa	100	00	100	100	100	00
9	10K Conalapa	100	00	100	100	100	00
10	15K Conalapa	92	00	92	81	90	10
11	20K Conalapa	88	88	88	00	00	100
12	25K Conalapa	70	70	70	00	00	100
13	0K Chocoyo	94	00	94	94	100	00
14	5K Chocoyo	100	00	100	100	100	00
15	10K Chocoyo	100	00	100	92	92	08
16	15K Chocoyo	88	00	88	78	89	11
17	20K Chocoyo	100	100	100	00	00	100
18	25K Chocoyo	64	64	64	00	00	100
19	0K Patzún	98	00	98	96	99	01
20	5K Patzún	100	00	100	100	100	00
21	10K Patzún	98	00	98	98	100	00
22	15K Patzún	96	00	96	92	96	04
23	20K Patzún	90	90	90	00	00	100
24	25K Patzún	62	62	62	00	00	100
25	0K Santa Ana	100	00	100	100	100	00
26	5K Santa Ana	100	00	100	100	100	00
27	10K Santa Ana	90	00	90	90	100	00
28	15K Santa Ana	98	00	98	53	54	46
29	20K Santa Ana	92	92	92	00	00	100
30	25K Santa Ana	62	62	62	00	00	100
31	0K Xequijel	100	00	100	100	100	00
32	5K Xequijel	100	00	100	100	100	00
33	10K Xequijel	100	00	100	70	70	30
34	15K Xequijel	92	00	92	53	58	42
35	20K Xequijel	90	90	90	00	00	100
36	25K Xequijel	62	62	62	00	00	100
37	0K Zaragoza	100	00	100	100	100	00
38	5K Zaragoza	100	00	100	100	100	00
39	10K Zaragoza	92	00	92	92	100	00
40	15K Zaragoza	100	00	100	89	89	11
41	20K Zaragoza	70	70	70	00	00	100
42	25K Zaragoza	72	72	72	00	00	100

Cuadro 12. Resultados de la fase tres, expresados en medias por tratamiento.

NUMERO	TRATAMIENTO	NUMERO DE CALLOS TRANSFERIDOS	BROTOS REGENERADAS	RELACION BROT REG/CALLOTRAS	PROMEDIO DE PPTO.VER/TRAT
1	0K Balan	98	59	60	8
2	5K Balan	100	70	70	9
3	10K Balan	85	39	46	8
4	15K Balan	70	21	30	7
5	20K Balan	00	00	0	0
6	25K Balan	00	00	0	0
7	0K Comalapa	100	50	50	9
8	5K Comalapa	100	70	70	12
9	10K Comalapa	100	36	36	6
10	15K Comalapa	81	24	30	3
11	20K Comalapa	00	00	0	0
12	25K Comalapa	00	00	0	0
13	0K Chocoyo	94	55	58	8
14	5K Chocoyo	100	70	70	8
15	10K Chocoyo	92	40	43	6
16	15K Chocoyo	78	24	31	3
17	20K Chocoyo	00	00	0	0
18	25K Chocoyo	00	00	0	0
19	0K Patzún	96	69	72	10
20	5K Patzún	100	90	90	11
21	10K Patzún	98	38	39	5
22	15K Patzún	92	32	35	5
23	20K Patzún	00	00	0	0
24	25K Patzún	00	00	0	0
25	0K Santa Ana	100	60	60	9
26	5K Santa Ana	100	60	60	9
27	10K Santa Ana	90	29	32	3
28	15K Santa Ana	53	22	42	3
29	20K Santa Ana	00	00	0	0
30	25K Santa Ana	00	00	0	0
31	0K Xequijel	100	60	60	14
32	5K Xequijel	100	80	80	16
33	10K Xequijel	70	38	54	10
34	15K Xequijel	53	32	60	7
35	20K Xequijel	00	00	0	0
36	25K Xequijel	00	00	0	0
37	0K Zaragoza	100	60	60	12
38	5K Zaragoza	100	90	90	19
39	10K Zaragoza	92	46	50	7
40	15K Zaragoza	89	28	31	5
41	20K Zaragoza	00	00	0	0
42	25K Zaragoza	00	00	0	0

Fig.2 COMPORTAMIENTO DE LAS VARIEDADES
EN CUANTO A LA VARIABLE % DE CALLOS

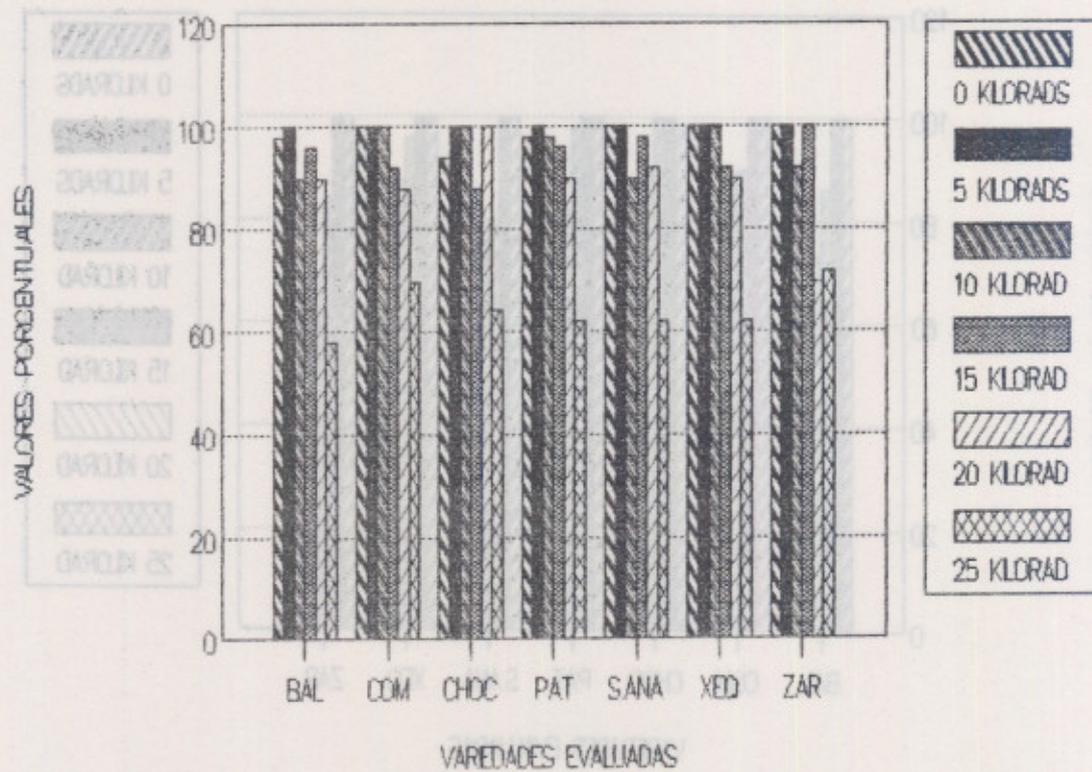


Fig.3 COMPORTAMIENTO DE LAS VARIETADES
CON LA VARIABLE % DE FRIABILIDAD

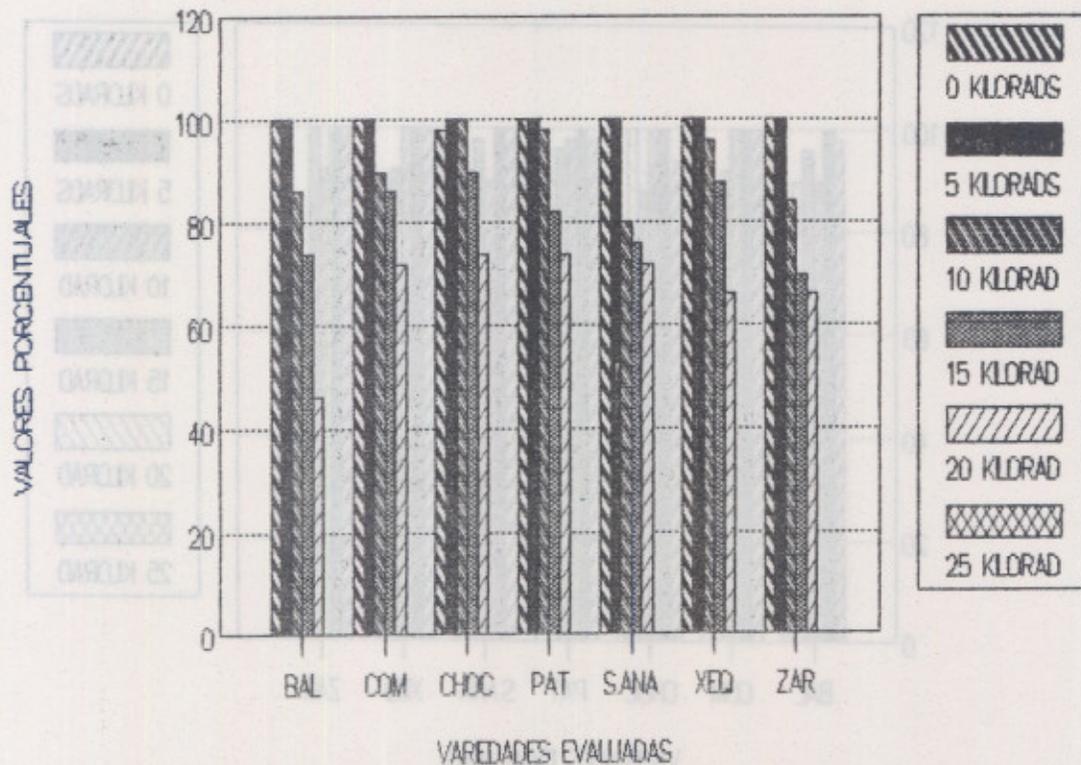


Fig.4 COMPORTAMIENTO DE LAS VARIETADES
CON LA VARIABLE % DE CALLOS CRECIDOS

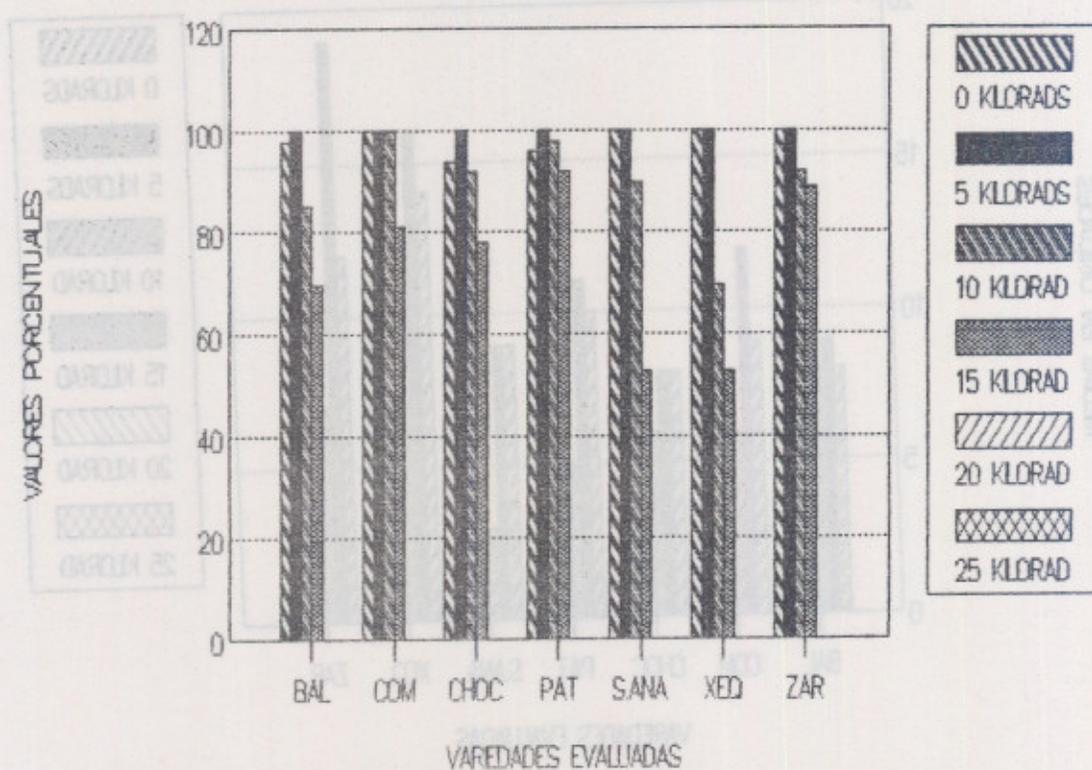


Fig.5 COMPORTAMIENTO DE LAS VARIEDADES
CON LA VARIABLE MEDIA DE PUNTOS VERDES

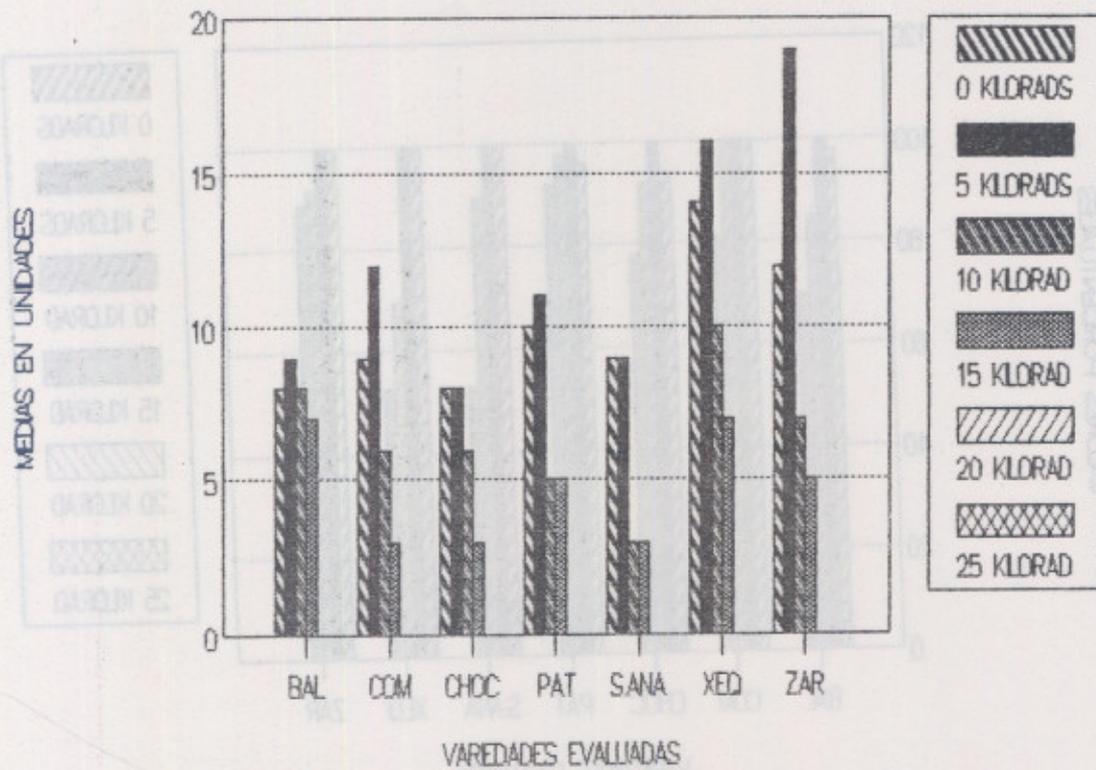


Fig.6 COMPORTAMIENTO DE LAS VARIETADES
CON LA RELACION PORC. BROTES/CALLO

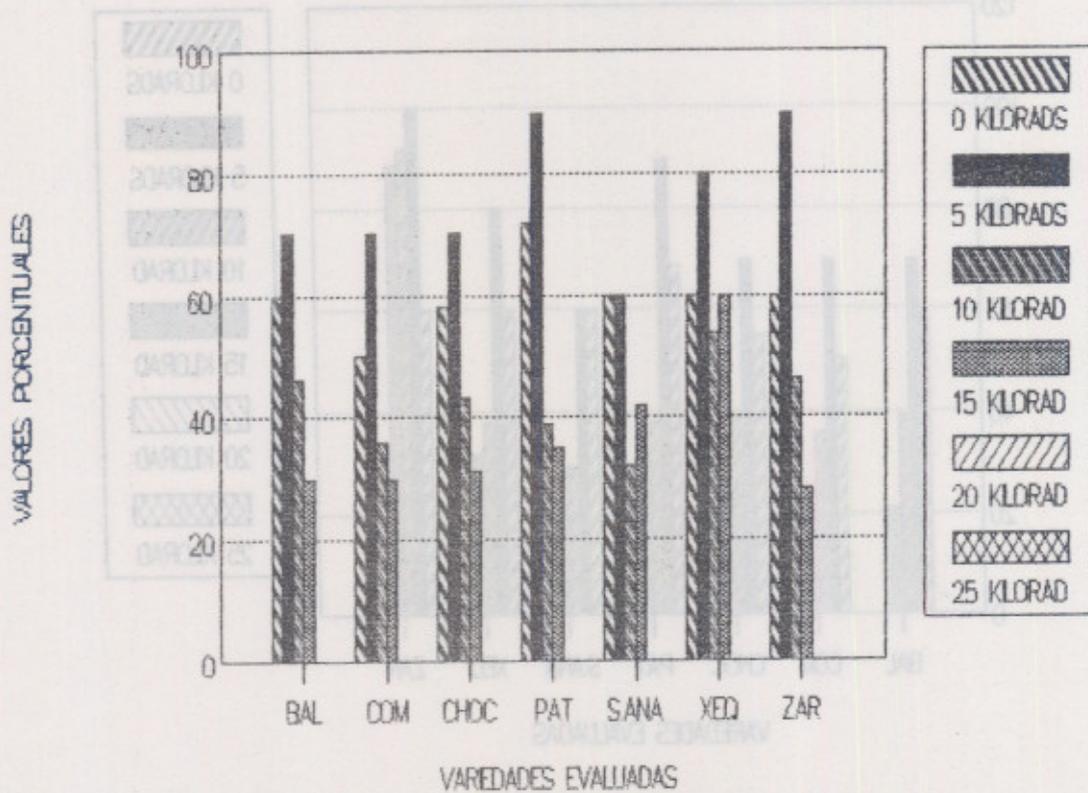
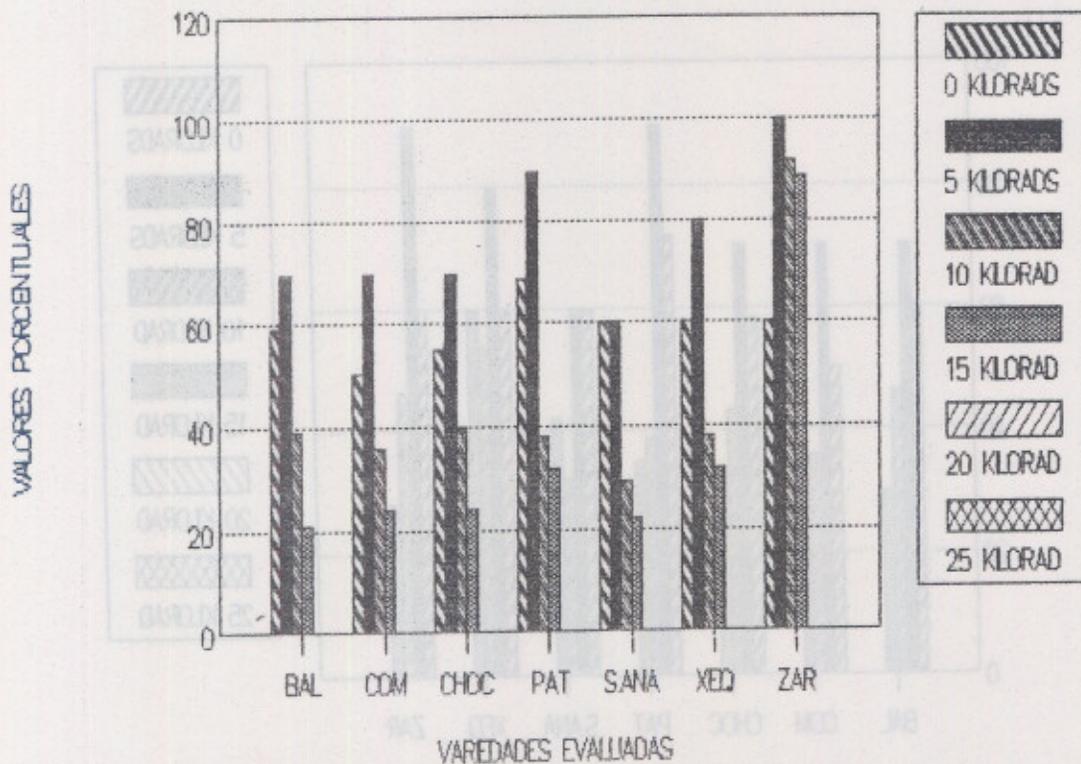


Fig.7 COMPORTAMIENTO DE LAS VARIEDADES
CON RELACION PORCENTAJE DE BROTES



UNIVERSIDAD DE LA GUAYAMA DE SAN CARLOS DE GUAYAMA
Biblioteca Central



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
 FACULTAD DE AGRONOMIA
 INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
 AGRONOMICAS

Ref. Sem.031-94

LA TESIS TITULADA: "RESPUESTA DE SIETE VARIETADES DE TRIGO (Triticum aestivum L.)
 A LA INDUCCION DE CALLO Y BROTES APICALES, A PARTIR DE CULTIVO
 DE EMBRIONES INMADUROS DERIVADOS DE PLANTAS PRODUCIDAS A PARTIR
 DE SEMILLA IRRADIADA CON SEIS DOSIS DE RAYOS GAMMA (Cesio 137)".

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: FRANCISCO RAFAEL IBARRA CIFUENTES

CARNET No: 86-17761

HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Ana Dolores Arévalo
 Ing. Agr. Fernando Rodríguez
 Ing. Agr. Edgar Franco
 Ing. Agr. Eduardo Pretzanzin

El Asesor y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha cum-
 plido con las normas universitarias y reglamentos de la Facultad de Agronomía de la
 Universidad de San Carlos de Guatemala.

Ing. Agr. Héctor Ramazzini Santos
 ASESOR



Ing. Agr. Rolando Lara Alecio
 DIRECTOR DEL IIA.

IMPRIMASE

Ing. Agr. Efraín Medina Guerra
 DECANO



c.c. Control Académico PARTADO POSTAL 1545 • 01901 GUATEMALA, C. A.
 Archivo /prr. TELEFONO: 769794 • FAX (5022) 769675

