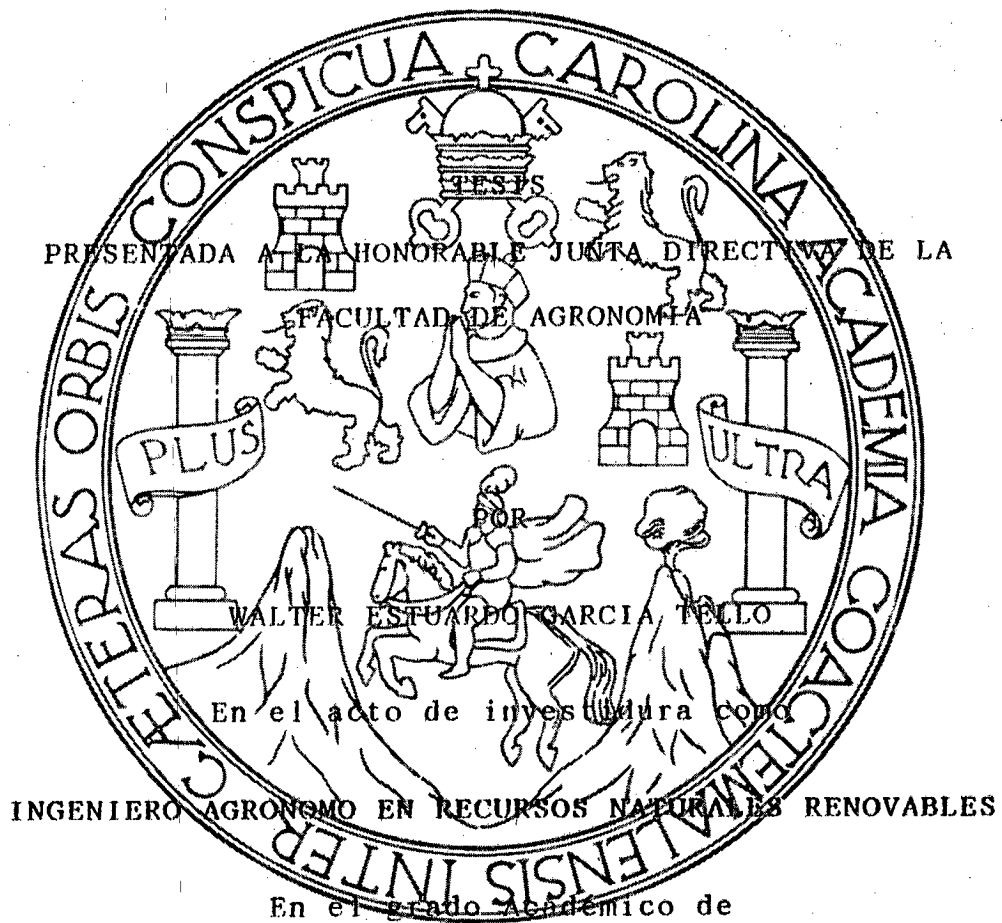


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS

ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE PINABETE (*Abies guatemalensis* Rehder.)
A SU REPRODUCCION VEGETATIVA IN VITRO UTILIZANDOS DOS MEDIOS DE
CULTIVO, DOS EXPLANTES Y SEIS COMBINACIONES HORMONALES.



LICENCIADO

Guatemala, Mayo de 1993.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

DL
01
T(1438)

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

Dr. ALFONSO FUENTES SORIA

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

- | | |
|-------------|---------------------------------|
| DECANO: | Ing. Agr. Efraín Medina |
| VOCAL I: | Ing. Agr. Mynor Estrada |
| VOCAL II: | Ing. Agr. Waldemar Nufio |
| VOCAL III: | Ing. Agr. Carlos R. Motta |
| VOCAL IV; | Br. Elías Raymundo |
| VOCAL V: | Br. Juan Gerardo de León |
| SECRETARIO: | Ing. Agr. Marco Romilio Estrada |

Guatemala, mayo de 1992.

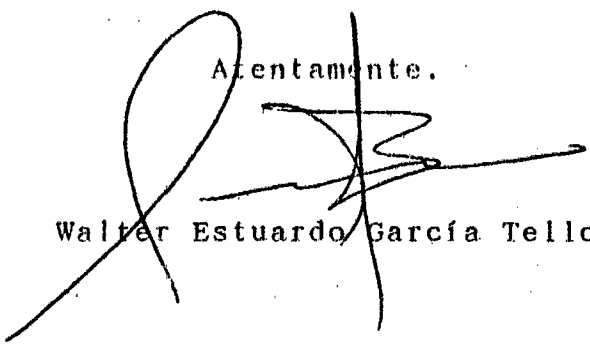
HONORABLE JUNTA DIRECTIVA
HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con lo establecido en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a su conocimiento el trabajo de tesis titulado:

**ESTUDIO DE LA RESPUESTA DEL PINABETE (Abies guatemalensis Rehder.)
A SU REPRODUCCION VEGETATIVA IN VITRO UTILIZANDO DOS MEDIOS DE
CULTIVO, DOS EXPLANTES Y SEIS COMBINACIONES HORMONALES.**

Como requisito previo a optar el titulo de INGENIERO AGRONOMO en RECURSOS NATURALES RENOVABLES, en el Grado Académico de LICENCIADO.

Atentamente.



Walter Estuardo García Tello

ACTO QUE DEDICO

A DIOS	Amigo y Compañero incondicional
A MIS PADRES	Juan Francisco García Olivia Zenaida Tello
A MIS ABUELOS	
A MIS HERMANOS	Gladys, Wilby, Wirna
A MI ESPOSA	Dora María Zea
A MI HIJO	Estuardo Lenín
A MIS TIOS	
A MIS PRIMOS	En especial a Manuel Vielman Tello
A MIS SOBRINOS	
A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS	

TESIS QUE DEDICO

A:

MI PATRIA GUATEMALA

A:

EL PUEBLO OBRERO CAMPESINO,
UNICA FUERZA PRODUCTIVA DEL PAIS

A:

LOS MARTIRES DE GUATEMALA EN ESPECIAL
A MARIO ARTURO DE LEON

A:

LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A:

LA FACULTAD DE AGRONOMIA

A:

LA ASOCIACION DE ESTUDIANTE UNIVERSITARIOS
"OLIVERIO CASTAÑEDA DE LEON"

A:

INSTITUTO TECNICO DE AGRICULTURA

AGRADECIMIENTOS

AL: PUEBLO DE GUATEMALA, QUE CON SUS IMPUESTOS
HA FINANCIADO EL CONOCIMIENTO DE LA CIENCIA
Y LA TECNICA.

A: LOS INGS. WALDEMAR NUFIO REYES, MARCO TULIO
ACEITUNO, JUAN JOSE CASTILLO MONT; POR SU
APOYO INCONDICIONAL

A: ERNESTO CARRILLO, POR SU CONTRIBUCION A MI
FORMACION PROFESIONAL Y HUMANA

A: MI ASESOR, ING HECTOR RONALDO RAMAZZINI

A: LOS COMPAÑEROS DE LA SUBAREA DE MATEMATICA Y
FISICA, POR SU AMISTAD Y APOYO.

CONTENIDO

TITULO	PAGINA
INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DE CUADROS	vi
RESUMEN	vii
1. INTRODUCCION	1
2. DEFINICION DEL PROBLEMA	3
3. JUSTIFICACION	4
4. MARCO TEORICO	5
4.1. La Biotecnologia	5
4.2. Cultivo de Tejidos en Coníferas	6
4.2.1 Importancia de la Propagación Vegetati- va en Coníferas	6
4.2.2. Reguladores de Crecimiento en la organogénesis	6
4.2.3. Inducción y Desarrollo de Yemas Adventicias en Coníferas	7
4.3. Estados En La Formación de Plantas	10
4.3.1. Iniciación de Yemas	10
4.3.2. Desarrollo de Yemas	10
4.3.3. Enraizamiento de los brotes	11
4.3.4. Transplante al suelo	11

TITULO	PAGINA
4.4. Aplicaciones del Cultivo In Vitro Para La propagación de Coníferas	12
4.4.1. Métodos Complejos	12
4.4.2. Métodos Simples	13
4.5. Potencial Para la Propagación en Gran Escala	13
4.6. Medio de Cultivo	14
4.6.1. Ingredientes del Medio de Cultivo	15
4.7. El Pinabete en Guatemala	19
4.7.1. Situación del Pinabete en Guatemala	19
4.7.2. Historia	20
4.7.3. Taxonomía	21
4.7.4. Distribución	21
4.7.5. Habitat	21
4.7.6. Clasificación	22
4.7.7. Plagas y Enfermedades	23
4.7.8. Propagación Vegetativa en Coníferas	24
5. OBJETIVOS	25
6. HIPOTESIS	27
7. MATERIALES Y METODOS	28
7.1. Ubicación del Area Experimental	28
7.2. Material Vegetal	28
7.3. Reactivos y Materiales	28
7.4. Cristalería y Equipo	28
7.5. Medios de Cultivo	29

TITULO	PAGINA
7.5.1. Preparación del Medio de Cultivo	29
7.5.2. Esterilización del Medio de Cultivo	29
7.6 Siembra del Material Vegetal	29
7.6.1. Siembra de Estacas de hoja	29
7.6.2. Siembra de Yemas terminales	30
7.6.3. Condiciones del Cultivo	30
7.7. Diseño Experimental	33
7.7.1. Tratamientos	33
7.7.2. Aleatorización	35
7.7.3. Unidad Experimental	36
7.7.4. Variable Respuesta	36
7.7.5. Análisis Estadístico	36
7.7.6. Modelo Estadístico	37
8. RESULTADOS Y DISCUSION	38
9. CONCLUSIONES	52
10. RECOMENDACIONES	54
11. BIBLIOGRAFIA	55

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
1. Sobrevivencia de estaca de hoja Vrs. Yema terminal de ramilla en medio MS. Mod. 0 mM. ANA y 25 mM. de BA.	43
2. Sobrevivencia de estaca de hoja Vrs yema terminal de ramilla en medio MS. Mod. 0 mM ANA y 50 mM de BA.	43
3. Sobrevivencia de estaca de hoja Vrs yema terminal de ramilla en medio MS. Mod. 10 mM ANA y 25 mM de BA.	44
4. Sobrevivencia de estaca de hoja Vrs yema terminal de ramilla en medio MS. Mod. 10 mM ANA y 50 mM de BA.	44
5. Sobrevivencia de estaca de hoja Vrs. yema terminal de ramilla en medio MS. Mod. 25 mM ANA y 25 mM de BA.	45
6. Sobrevivencia de estaca de hoja Vrs. yema terminal de ramilla en medio MS. Mod. 25 mM ANA y 50 mM de BA.	45
7. Sobrevivencia de estaca de hoja Vrs. yema terminal de ramilla en medio GD. Mod. 0 mM ANA y 25 mM de BA.	46

FIGURA	PAGINA
8. Sobrevivencia de estaca de hoja Vrs. yema terminal de ramilla en medio GD. Mod. 0 mM ANA y 50 mM de BA.	46
9. Sobrevivencia de estaca de hoja Vrs. yema terminal de ramilla en medio GD. Mod. 10 mM ANA y 25 mM de BA.	47
10. Sobrevivencia de estaca de hoja Vrs. yema terminal de ramilla en medio GD. Mod. 10 mM ANA y 50 mM de BA.	47
11. Sobrevivencia de estaca de hoja Vrs. yema terminal de ramilla en medio GD. Mod. 25 mM ANA y 50 mM de BA.	48
12. Sobrevivencia de estaca de hoja Vrs. yema terminal de ramilla en medio GD. Mod. 50 mM ANA y 50 mM de BA.	48

INDICE DE CUADROS

1. Forma iónica de aplicación de algunos nutrientes en los medios para cultivo in vitro.	17
2. Composición del medio Basal de Murashige y Skoog modificado	31
3. Composición del Medio Basal de Gresshoff y Doll modificado	32
4. Combinaciones hormonales	33
5. Matriz bruta del porcentaje de inoculos que formaron callos en los tratamientos evaluados.	38
6. Resultado del análisis de Tukey	40

ESTUDIO DE BFA RESPUESTA DEL PINABETE (Abies guatemalensis Rehder.) A SU REPRODUCCION VEGETATIVA IN VITRO UTILIZANDO DOS MEDIOS DE CULTIVO, DOS EXPLANTES Y SEIS COMBINACIONES HORMONALES.

STUDY OF THE RESPONSE OF FIR (Abies guatemalensis Rehder.) TO IT'S IN VITRO VEGETATIVE REPRODUCTION, USING TWO EXPLANTS, TWO CULTURE MEDIA AND SIX HORMONAL COMBINATIONS.

RESUMEN

El Pinabete (Abies guatemalensis Rehder.), especie forestal, declarada en vía de extinción, influyendo varios factores entre ellos la dificultad que presenta para su reproducción por medio de la semilla, siendo necesario la investigación de técnicas alternativas, para su reproducción y propagación.

En el presente estudio, se evaluó la respuesta del pinabete (Abies guatemalensi Rehder.) a su reproducción vegetativa in vitro, para lo cual se utilizaron como explantes, yemas terminales de ramilla y estacas de hojas, sembradas en los medios Murashige y Skoog modificado y Gresshoff y Doll modificado, suplementado con seis combinaciones de reguladores del crecimiento el ácido naftalenacético y Benciladenina. El material fue obtenido de un rodal establecido en la aldea Los Encuentros, Sololá, consistiendo en ramas de donde se obtuvieron los explantes, que seleccionados y desinfectados se sembraron en los correspondientes medios, suplementados con las combinaciones de reguladores del crecimiento.

Para la ejecución del experimento, se trabajo con 24 tratamientos, 5 repeticiones distribuidos en un diseño completamente al azar con arreglo combinatorio en tres factores,

siendo la unidad experimental 2 frascos de 125 ml., con 25 ml. del medio de cultivo, la respectiva combinación de los reguladores del crecimiento y 5 explantes/frasco. Las variables respuestas evaluadas fueron: Porcentaje de inóculos que formaron callos, brotes, plantas completas y el porcentaje de sobrevivencia de los explantes en el medio de cultivo.

El análisis estadístico, fue aplicado solamente a la variable respuesta, porcentaje de inóculos que formaron callos, ya que para las otras variables respuesta no ameritó el mismo, aclarando que inicialmente fue diseñado con un arreglo trifactorial, sin embargo el explante estaca de hoja no respondió a la variable respuesta, eliminandose como factor, por lo tanto se aplicó un análisis de varianza para un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial, a un 5% de significancia, luego una prueba de tukey, para determinar los mejores tratamientos.

Se concluyó que para el efecto del presente estudio, el pinabete (Abies guatemalensis Rehder.) responde favorablemente a la formación de callos y a la brotación en yemas terminales de ramillas, aceptandose la hipótesis planteada, para lo cual los tratamientos que mejor respondieron a la variable, porcentaje de inóculos que formaron callos son: Explante yema terminal sembrado en el medio Murashige y Skoog modificado, suplementado con 10 mM. de ANA. y 50 mM. de BA.; El explante yema terminal sembrado en el medio Murashige y Skoog modificado suplementado con 25 mM. de ANA. y 50 mM. de BA. El explante yema terminal es el que manifestó mayor

capacidad de sobrevivencia sin discriminar medio de cultivo ni combinación de reguladores del crecimiento. La variable respuesta porcentaje de inóculos que formaron plantas completas, no se manifestó en ningún tratamiento evaluado.

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos de la subárea de Manejo y Mejoramiento de plantas, Area Tecnológica de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

1) INTRODUCCION:

Guatemala, es un país rico en recursos naturales, contándose entre ellos el bosque, en el cual hasta ahora no ha existido planificación adecuada en su manejo y explotación, ya que en 1950 se contaba con el 67.78% del área cubierta boscosa, para 1979 se contaba solamente con el 24.34%; en 1975 se cortaron 6.8 millones de metros cúbicos, calculándose que para el 2000 ascendería a 10 millones de metros cúbicos de madera. (6)

El Pinabete (Abies guatemalensis Rehder.) es una especie forestal declarada en vía de extinción, por su sobre explotación y la dificultades que presenta para su reproducción y propagación; haciéndose necesario la investigación de técnicas alternativas, para su reproducción, como el cultivo de tejidos.

En el presente estudio, se evaluó la respuesta del (Abies guatemalensis Rehder.) a su reproducción vegetativa in vitro, utilizando estacas de hoja y yemas terminales de ramilla de tallo, cultivadas en medios basales de Murashige y Skoog modificados (MSM); Gresshoff y Doll modificados (GDM), suplementados con seis combinaciones de reguladores del crecimiento; Benciladenina (BA) y Acido Naftalenacético (ANA), siendo las variables respuesta; Porcentaje de inóculos que formaron callo, que brotaron, que formaron plantas completas y porcentaje de sobrevivencia.

Los mejores tratamientos para la variable callos fueron cultivando yemas terminales de ramilla en medios MS modificado suplementado con 10 mM. de ANA. y 50 mM. de BA. y yemas terminales

de ramilla sembradas en MS. modificado suplementado con 25 mM. de ANA. y 50 mM. de BA. En cuanto a la variable Brotación el mejor resultado se dio cuando el yemas terminales de ramilla fueron sembradas en el medio MS. modificado, suplementado con 25 mM. de BA.; en la variable porcentaje de sobrevivencia, fue el explante yemas terminales de ramilla el que presentó mejores resultados, sin importar el medio y la combinación de reguladores del crecimiento. La variable porcentaje de inóculos que formaron plantas completas no se manifestó en ningún tratamiento. El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

2) DEFINICION DEL PROBLEMA:

El Pinabette (Abies guatemalensis Rehder.), especie en peligro de extinción, presenta dificultades en su propagación por medio de la semilla, siendo necesario la investigación de técnicas alternativas para su reproducción y propagación vegetativa.

3) JUSTIFICACION:

El pinabete (Abies guatemalensis Rehder.), especie forestal que en 1941, Guatemala la incluyó en el listado de especies arbóreas y fauna que deben protegerse y en 1979 el servicio de pesca y fauna silvestre de los Estados Unidos, la declaró como especie en vía de extinción, para lo cual influyen muchos factores como: la ampliación de la frontera agrícola, explotación irracional, falta de programas para su manejo y aprovechamiento, su utilización como fuente de energía, la baja viabilidad de la semilla, condiciones microambientales necesarios para su reproducción por medio de la semilla, entre otros.

En ese sentido es de gran importancia la investigación de posibles alternativas para su reproducción, usando partes vegetativas. Entre dichas alternativas se encuentra la técnica de cultivo de tejidos; justificándose de esta forma la investigación de la respuesta de esta especie forestal, a su propagación in vitro, utilizándose estacas de hoja y yemas terminales de ramilla.

4) MARCO TEORICO:

4.1.- La Biotecnología: (antecedentes históricos, avances y perspectivas)

Los primeros estudios sobre la técnica del cultivo de tejidos en especies forestales se iniciaron en la década de 1,950, cuando Ball cultivó callos de Sequoia sempervirens para la diferenciación de yemas. Sin embargo en estos ensayos la organogénesis no fue posible sino hasta después de que en la década de 1,960 se realizaron investigaciones relacionadas con el enriquecimiento de los medios de cultivo, de acuerdo a los requerimientos de la especies de coníferas cultivadas (7).

La reproducción de especies forestales fue acelerada después de que el Dr. Brow en 1,974 publicó sus investigaciones sobre la diferenciación in vitro de Pinus palustris a partir de cotiledones embrionales, siendo esta la primera conífera producida con la técnica de cultivos vegetales. Desde este punto de partida, otros investigadores han logrado inducir la organogénesis a partir de células en suspensión (Durzan y Chalupa en 1971) y del aislamiento de protoplastos. Huntien en 1972 diferenció raíces y brotes de Picea abies a partir del cultivo in vitro de megatofitos haploides (7).

La aplicación de la ingeniería genética a través de la biotecnología en un futuro permitirá incrementar la producción forestal a través de la producción masiva de plantas y del mejoramiento genético que ofrezca resistencia a plagas y enfermedades y condicionamiento climático de varias especies (7).

4.2.- CULTIVO DE TEJIDOS EN CONIFERAS:

4.2.1. Importancia de la propagación vegetativa en coníferas.

En todo programa de producción, manejo y aprovechamiento de plantas es importante la domesticación y el mejoramiento genético. La propagación vegetativa contribuye a que los progenitores genéticamente uniformes se puedan propagar en gran escala, obteniendo híbridos que se pueden propagar clonalmente para multiplicar y seleccionar características derivadas de los genes aditivos, manteniendo los clones como bancos de germoplasma y poder recombinar mediante polinización cruzada estos individuos, para luego emplearlos en plantaciones comerciales. Además con la propagación asexual de plantas se puede incrementar el rendimiento de cualquier generación y acelerar el proceso de propagación de aquellas especies cuya semilla presenta problemas de germinación lenta y baja (7).

4.2.2. Reguladores de crecimiento en la organogénesis.

La inducción de organogénesis se inicia mediante los mecanismos del metabolismo celular de los callos, los cuales pueden modificarse. Los reguladores del crecimiento juegan un papel muy importante en la aparición de estos mecanismos debido a que la mayor parte de la actividad fisiológica de los vegetales está mediada por ellos al actuar como sustancias mensajeras muy activas en pequeñas cantidades en múltiples procesos y en distintas partes de la planta (7).

Perea Dallos en 1988, argumenta que para la formación de callos para la inducción de yemas adventicias es necesario un balance adecuado de citoquininas y auxinas endógenas adicionadas a un determinado medio basal en concentraciones bajas (10).

Villalobos, indica que las auxinas no son necesarias, pero que en algunas especies pueden resultar benéfica complementar los medios con bajas concentraciones de este regulador del crecimiento.

Franco, (4) cultivó cotiledones de Pinus oocarpa induciendo mayor cantidad de yemas adventicias al agregar 10 mM. de benciladenina (BA) y 10 mM. de Acido naftalenacético (ANA) al medio basal de Gresshoff y Doll, modificado; sin embargo en el medio básico de Murashige y Skoog la mayor cantidad de yemas adventicias se produjo aplicando 10 mM. de BA. y 25 mM. de ANA.

4.2.3. Inducción y desarrollo de yemas adventicias en coníferas.

David en 1982, citado por Bonga (1) indica que las regiones meristemáticas primarias, localizadas en las axilas de los cotiledones y hoja jóvenes y estructuras desarrolladas de esas regiones, pueden convertirse en yemas axilares o brotes y que tejidos que nunca fueron destinados para la propagación de plantas in vitro, inducen a la formación de yemas adventicias.

Para la inducción de yemas adventicias se han utilizado explantes como embriones intactos, hipocotilos, acículas, ápices de brotes y cotiledones. En cotiledones se ha demostrado que las combinaciones de reguladores del crecimiento utilizadas en los medios

basales varía según la especie que se esté cultivando, sin embargo la mejor citoquinina utilizada ha sido la Benciladenina (BA) ya sea sola o combinada con otras auxinas, otras citoquininas como la kinetina han demostrado ser menos eficientes (1).

En cultivos de Pseudopsuga menziessi se han cultivado cotiledones y se ha observado que la división comienza cuatro días después del cultivo y veinte días después se inician los brotes desde las capas epidermales y subepidermales de tejidos (1).

Campell y Durzan en 1975, citado por Bonga (1), reportan que la formación de yemas adventicias en cultivos de cotiledones de Pinus taeda se manifestó después de 6 a 10 semanas del cultivo, ellos indican que la presencia de reguladores del crecimiento en el medio inició la formación de estructuras adventicias, pero usualmente previno el desarrollo de brotes, por lo que fue necesaria la remoción de los reguladores del crecimiento transfiriendo los explantes con yemas adventicias a un medio de reguladores de crecimiento antes de la elongación para la formación de brotes.

Se han realizado cultivos de hipocotilos en Picea glauca, notándose que la iniciación de yemas adventicias incrementó con la adición de reguladores del crecimiento como BA + ANA o BA. Campell y Durzan, citados por Bonga (1) demostraron que el desarrollo de brotes en las yemas formadas fue inhibido y se promovió hasta que los hipocotilos fueron trasladados a medios basales, sin reguladores de crecimiento.

Claro está que el desarrollo de brotes a partir de yemas adventicias necesita del traslado de los cotiledones de un medio basal sin ellos, pero no es ésta la única forma de inducir el desarrollo de yemas aunque así sea la forma mas eficiente (1).

En Pinus radiata, los traslados a diferentes medios con intervalos de tres semanas y reducción del nivel de sacarosa han resultado muy eficientes. En algunos casos la reducción del contenido de macro y micronutrientes en un 50% han sido efectivo y en otros casos se ha utilizado la adición de carbón activado en proporciones que varia de 0.1 a 1%, pero su efecto aún no está muy claro aunque se cree absorbe excesos de hormonas o sustancias inhibitorias (1).

Otros factores que permiten la elongación de brotes son la adición de vitaminas "D" en concentraciones de 5 mM., la luz roja lejana y las altas intensidades de luz. También el Acido giberélico (GA3) muestra efectos de elongación de entrenudos, pero en coníferas no ha tenido ningún efecto (1).

A pesar de la variabilidad de formas de inducir el desarrollo de yemas, Montt, citado por Villalobos (10), indica que la exposición de los explantes a concentraciones hormonales durante un período corto, transfiriendose después a un medio basal sin hormonas antes de que la formación de brotes adventicias sea visible, ha dado resultados mas satisfactorios (1).

4.3.-ESTADOS EN LA FORMACION DE PLANTAS.

4.3.1. Iniciación de yemas.

Como se indicó anteriormente la iniciación de yemas se produce luego de cultivar los explantes en un medio basal adecuado y utilizando las combinaciones de reguladores del crecimiento apropiados (10).

En cultivos de embriones, son las células epidérmicas e hipodérmicas las que están involucradas en la diferenciación y proliferación de yemas adventicias, las cuales ocurren en la periferia del tejido, los cotiledones que no entran en estado latente, muestran mayor efectividad para sintetizar ADN y ARN ya que el proceso de respiración es acelerado, modificando rápidamente las sustancias de reserva (azúcares, lípidos y proteínas) para producir carbono, nitrógeno y la energía necesaria para la formación de brotes adventicios (10).

4.3.2. Desarrollo de yemas.

El desarrollo de yemas consiste en el desarrollo de brotes a partir de primordios foliares o la formación de pequeñas plántulas a partir de las yemas adventicias. Este desarrollo requiere del traslado de los explantes de un medio nutritivo que contenga el balance adecuado de reguladores del crecimiento combinados a un medio nutritivo con diferentes concentraciones de los mismos o carentes de ellos (10).

4.3.3. Enraizamiento de los brotes.

Para inducir la formación de raíces es necesario proporcionar ciertas condiciones de cultivo tales como la reducción de la cantidad de sales, del contenido de sacarosa (de 0.5 a 1%), del régimen de temperatura y mantener el cultivo en la obscuridad durante los primeros 10 días. Otro factor importante es la adecuada dotación de reguladores del crecimiento, específicamente auxinas, aunque bajas concentraciones de citoquininas pueden resultar benéficas (7).

Al igual que para el proceso de inducción de desarrollo de yemas, cuando los primeros primordios radiculares se han formado es necesario el paso de los explantes de un medio basal con reguladores del crecimiento a un medio basal sin reguladores del crecimiento para favorecer la elongación de raíces (7).

4.3.4. Transplante al suelo.

Las plántulas están listas para su transplante al suelo cuando se observa un equilibrio entre el tallo y la raíz de la misma. Para el efecto deben eliminarse todos los residuos de agar, evitando con ello posibles contaminaciones por hongos; además deberá mantenerse una gradual medición de humedad hasta las condiciones del semillero (7).

4.4.- APLICACIONES DEL CULTIVO IN VITRO PARA LA PROPAGACION DE CONIFERAS

Los métodos tradicionales de producción de coníferas han sido por semilla y por estacas enraizadas, pero estas formas de producción a pesar de que han resultado relativamente de bajo costo requieren mucho tiempo para producir un pequeño número de plantas.

Respecto a la técnica de la micropropagación muchos argumentan que la producción de plantas es elevada de 3 a 30 veces mas que usando técnicas de vivero normal, sin embargo Rediske, citado por Dodds(2), estima que la propagación in vitro reduce el valor de producción en un 30% con relación a las plantas producidas por semilla. Además McKeand, citado por el mismo autor (2), sugiere la aplicación de la micropropagación para fines comerciales ya que la producción de plantas es masiva y puede obtenerse en un período de 8 a 12 años menos que por los métodos tradicionales.

En inducción de yemas adventicias y enraizamiento de muchos órganos es muy importante la aplicación de la micropropagación para fines de producción de plantas en coníferas, de tal manera que para ello Dodds (2) describe métodos simples y complejos como los siguientes:

4.4.1. Métodos complejos.

- Inducción de yemas adventicias sobre un embrión disectado en un medio conteniendo reguladores del crecimiento.
- Crecimiento de las yemas adventicias inducidas en un medio libre de reguladores del crecimiento.

- Escisión de los meristemas apicales e iniciación de la raíz en un medio conteniendo reguladores del crecimiento.
- Crecimiento de las raíces adventicias en un medio simple sin reguladores del crecimiento.
- Establecimiento de plantas en el suelo.
- Plantado en el campo.

4.4.2. Métodos simples:

- Extensión de un meristemo esterilizado y la proliferación de yemas axilares en un medio sin reguladores del crecimiento.
- Escisión de las yemas axilares y futura extensión y proliferación en un medio sin reguladores del crecimiento.
- Enraizamiento bajo un medio húmedo.
- Establecimiento de plantas en el suelo,
- Plantado en el campo.

4.5. POTENCIAL PARA LA PROPAGACION EN GRAN ESCALA.

Dentro de las perspectivas de la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos en coníferas se espera la propagación masiva de plantas debido a las ventajas que la micropropagación presenta y a que el actual sistema de propagación en coníferas es incosteable y tiene importantes limitaciones; pese a ello la Asociación Foret-Cellulose (AFOSEL) en Francia, no ha logrado la propagación masiva de plantas para semillero de S serpenvirens, produciendo únicamente 30,000 plantas provenientes de 200 clones seleccionados, caso igual sucede con el Instituto de Investigaciones Forestales (FRI) de

Nueva Zelanda, quien ha logrado producir 100 plantas de Pinus radiata, anualmente a un costo mayor que las plantas obtenidas por semilla. Sin embargo en los Estados Unidos se ha implantado un programa de reforestación para el estado de Florida, para el cual se ha logrado producir 7.5 millones de Eucaliptus sp (5).

La técnica del cultivo de tejidos en coníferas debe de utilizarse como un intermedio entre lo que es una propagación masiva y el costo de propagación, aunque se cree que una propagación masiva será una realidad cuando se plasme la técnica del cultivo de células en suspensión puesto que ella presenta la ventaja de que se omiten las etapas y estados de desarrollo que son necesarios para obtener una planta ya que éstas se obtendrían directamente de los embríoides obtenidos de estas células que se multiplican en gran cantidad en medios líquidos. Esta técnica de cultivos en suspensión se ha estudiado en muchas especies forestales pero sólo algunas angiospermas han respondido satisfactoriamente (5).

4.6.- MEDIO DE CULTIVO

El establecimiento de cultivos para casi todas las partes de una planta en diversas especies depende del medio nutritivo adecuado que se utilice, así como del uso de explantes viables, de las combinaciones de reguladores del crecimiento adecuadas, de las condiciones de incubación y de la calidad de los reactivos (5).

4.6.1. Ingredientes del medio de cultivo.

4.6.1.1. Sales Inorgánicas.

Las mezclas de sales inorgánicas se utilizan con la finalidad de optimizar las necesidades de plantas específicas, de ello surge que a través de muchas investigaciones se han generado varias mezclas salinas que contienen micronutrientes como fuentes de carbono, hidrógeno, oxígeno, calcio, magnesio y azufre. También posee micronutrientes para una adecuada actividad metabólica de los cuales los más esenciales son el hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, cobalto y molibdeno, agentes quelatos como el ácido etilendinitrotetra-acético (EDTA) (7).

4.6.1.2. Vitaminas.

Las vitaminas son requeridas en pequeñas cantidades y actúan como catalizadores metabólicos. La única vitamina que se ha demostrado tener mayor importancia en cultivos de células y órganos es la Tiamina en concentraciones de 0.1 a 0.3 mg/l, algunas otras vitaminas se utilizan debido a que pueden estimular procesos de crecimiento específicos (7).

4.6.1.3. Reguladores del crecimiento.

Los reguladores del crecimiento utilizados son las citoquininas y las auxinas en concentraciones que varían según la especie, pero generalmente las citoquininas se utilizan en concentraciones de 0.03 a 30 mg/l, mientras que las auxinas se utilizan a razón de 0.1 a 10.0 mg/l (7).

Las auxinas contribuyen a la elongación celular y las que más se utilizan, dentro de este grupo son el ácido Indolbutírico (AIB) y el ácido Naftalenacético (ANA), mientras que las citoquininas promueven la división celular y la organización de callos utilizándose dentro de este grupo en forma más común la Benciladenina (BA) y la Kinetina (7).

4.6.1.4. Carbohidratos.

Los carbohidratos constituyen la fuente de energía y los reguladores osmóticos. La fuente de energía utilizada universalmente es el azúcar común (7).

4.6.1.5. El Agua.

El agua se utiliza en la preparación de soluciones y debe ser bidestilada, tridestilada y desmineralizada. Su función es servir como solvente de la mayor parte de los ingredientes del medio (7).

4.6.1.6. Suplementos no definidos.

Los suplementos no definidos se utilizan para enriquecer los medios de cultivo, frecuentemente se han utilizado como una alternativa después de todos los ingredientes definidos han fallado dentro del medio. Algunos de los suplementos no definidos utilizados han sido el extracto de levadura, jugos y extractores de varios frutos, caseína hidrolizada, ácido ascórbico y absorbentes como el carbón activado (7).

4.6.2. Consideraciones generales.

Con la finalidad de optimizar los requerimientos nutricionales de los tejidos a cultivar, deben tomarse en cuenta ciertas consideraciones que contribuirán al éxito en la inducción de organogénesis (7).

4.6.2.1. Sales Inorgánicas.

Para el suplemento de sales inorgánicas deben de tomarse en cuenta las interacciones iónicas que pueden darse, así como las formas iónicas de los nutrientes a adicionar. La tabla 1, muestra la forma iónica más eficiente de aplicación de algunos nutrientes.

Cuadro No.1. FORMA IONICA DE APLICACION DE ALGUNOS NUTRIENTES EN LOS MEDIOS NUTRITIVOS PARA CULTIVOS IN VITRO.

Elemento	Forma Iónica
Nitrógeno	NO_3^- o NH_4^+
Fósforo	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ o KH_2PO_4
Potasio	KCl , NO_3^- o KH_2PO_4
Calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Cloruro	KCl o CaCl_2

4.6.2.2. Reguladores del crecimiento.

Otro aspecto de suma importancia es el suplemento de reguladores del crecimiento. Debe de considerarse que estas sustancias son básicas para todos los procesos de desarrollo, las auxinas son particularmente importantes para la inducción radicular; mientras que las citoquininas promueven la formación de brotes. La eficiencia de ellas depende de la auxina o citoquinina que se trate y del balance o relación en que se proporcione a los medios de cultivo (7).

4.6.2.3. Pureza de los ingredientes.

Respecto a la pureza de los ingredientes éstos deben ser químicamente puros, algunas sustancias orgánicas pueden necesitar recristalización. El agua a emplear debe ser bidestilada, tridestilada y desmineralizada, así mismo los materiales de soporte deben ser muy limpios. El agar debe de tener una pureza bien especificada y cuando se tenga duda de su pureza debe de lavarse efectuando varios enjuagues con agua destilada (7).

4.6.2.4. Calidad física del medio gelificante.

El medio gelificante más ampliamente utilizado es el agar en concentraciones de 0.6 a 1% pero cuando este tiene muchas impurezas puede utilizarse sílica gel o Poliacrilamida. Debe de tomarse en cuenta las condiciones de pH. puesto que un medio ácido tiene problemas de gelificación y en medio alcalino el gel queda muy firme (7).

4.6.2.5. Cantidad del medio de cultivo por recipiente.

La cantidad de medio de cultivo por recipiente debe ser balanceada de acuerdo a la masa del explante y a la cantidad de nutrientes, puesto que los inóculos muy pequeños se ven muy afectados por grandes cantidades del medio, de la misma manera el crecimiento de inóculos grandes frecuentemente esta restringido por un inadecuado suministro del medio (7).

4.6.2.6. Esterilización del medio.

Existen varios métodos de esterilización de medios tales como la radiación, la esterilización por gas y la esterilización por autoclave. Este último es el método de esterilización mas conveniente, sin embargo debe de tomarse en cuenta que la esterilización por autoclave altera mucho los ingredientes, incluyendo algunos que no estan clasificados como termoábiles. Los calentamientos prologados inactivan los factores del crecimiento, degradan azúcares, aminoácidos y reducen la calidad del gelificante agar (7).

4.7. EL PINABETE EN GUATEMALA.

7.1. Situación actual del pinabete en Guatemala.

El pinabete (Abies guatemalensis Rehder.) es una especie nativa, cuya madera es preferida entre otras coníferas debido a su suavidad y a su utilidad en construcciones y como combustible. El Abies guatemalensis Rehder. es conocida además de pinabete como romerillo y pashque (6).

La explotación de los rodales por parte de los exportadores de madera, de las personas que lo utilizan como leña y de los campesinos que buscan la ampliación de la frontera agrícola ha permitido que las poblaciones de esta especie se reduzca grandemente en nuestro país, a tal grado que en 1941 Guatemala colocó a esta especie dentro de la lista de protección de especies arbóreas y de fauna que debe protegerse y en 1979 el Servicio de Pesca y Fauna Silvestre de los Estados Unidos declaró a Abies guatemalensis Rehder. como una especie en vía de extinción (3).

4.7.2. Historia.

Se cree que el pinabete, migró desde Norte América hasta el sur de México a mediados de la era terciaria, hace aproximadamente 16 millones de años. Las montañas de Guatemala fueron pobladas por esta especie de manera muy acelerada, desplazando a gran cantidad de especies de otras coníferas, pero fueron deforestadas parcialmente por el cultivo migratorio de los Mayas (3).

Mucho antes de la llegada de los españoles a principios del siglo XVI. Debido a la necesidad de construcción de vivienda durante la colonización la deforestación se incrementó; sin embargo las poblaciones de abeto, aun eran abundantes en el altiplano occidental de Guatemala hasta el siglo XIX, pero a finales de los años 50 la mayor parte de los rodales exceptuando a aquellos que

se encontraban en tierras del gobierno, habían sido profusamente explotados (3).

4.7.3. Taxonomía.

Las descripciones taxonómicas de Abies guatemalensis fueron suministradas por Rehder en 1939, Standley & Hughes en 1983 y McCarter en 1986. Martínez en 1963 reconoció dos variedades de Abies guatemalensis : A guatemalensis var. tacanensis (Lund) Mart. que se encuentra principalmente a lo largo de la frontera entre México y Guatemala en Chiapas y San Marcos y A guatemalensis Variedad Jaliscana Mart. que fue identificada inicialmente en Jalisco y sus alrededores (6).

4.7.4. Distribución.

El Abies guatemalensis Rehder. se encuentra distribuido desde el sur de México hasta Guatemala, El Salvador y Honduras.

4.7.5. Habitat.

En Guatemala los rodales de Abies guatemalensis Rehder. se encuentra en medios montañosos subtropicales templados húmedos a alturas comprendidas entre 2,700 a 3,000 metros sobre el nivel del mar, con 1,500 a 3,000 mm de precipitación pluvial anual y un rango de temperatura de -12 a 14 grados centígrados. Se encuentra asociado a especies como Pinus ayacahuite Ehren, Cupressus lusitánica Miller. y Pinus rudis Endl (9).

Se localiza en el cerro Santa María Tecún, Quiche, Cumbre del Aire, San Francisco el Alto y Momostenango, sierra de los cuchumatanes, Chancol, San Mateo Ixtatán, Huehuetenango, Volcán Zunil, Montañas del sur-este de Palestina, Quetzaltenango, Volcanes Tajumulco, Tacaná en San Marcos y región Serchil (6).

Abies guatemalensis Rehder. generalmente se adapta a suelos profundos bien drenados con un contenido de materia orgánica de 2,5% a 5%, con pH de 5.4 a 5.7, aunque pueden crecer en suelos con pH entre 6.0 a 6.5; con horizontes del subsuelo de arcilla arenosa con capacidad de intercambio catiónico menos de 15 meq/100cc. (8).

4.7.6. Clasificación Taxonómica.

Reino	Plantae.
Sub-Reino.....	Embryobionta.
División.....	Pinophyta.
Sub-División.....	Pinicae.
Clase	Pinopsida.
Orden	Pinales.
Familia.....	Pinaceae.
Genero.....	Abies.
Especie.....	<u>Abies guatemalensis</u> Rehder. 1939.
	<u>Abies guatemalensis</u> Lundell. 1940.
	<u>abies guatemalensis</u> Var. Tacanensis (Lundell) Martinez. 1948.
Nombre Común.....	Pinabete, Patshac.

De acuerdo a su descripción es un árbol hasta de 45 metros de alto, con un tronco casi de 1 metro de diámetro o quizá a veces mas grande, las ramas son de color oscuro a café grisáceo, las ramillas jóvenes de color castaño o café rojizo, con pelos

esparcidos cerca del ápice; las hojas apareadas en dos surcos, extendidas y ascendentes y algo divergentes, son lineales de 1-4.5 cms de largo y de 1-2 mm de ancho, con el ápice obtuso y usualmente marginado, lustrosos y oscuros o mas bien verde claro en el haz, plateado en el envés; el haz, esta surcado por la mayor parte de su longitud. La nervadura se eleva en el envés, los márgenes son recurvados, los estomas conspicuos en el envés, tiene canales resiníferos, sub-epidérmicos, el hipodermo bien desarrollado é interrumpido, dos paquetes fibrovasculares cercanos pero distinguibles; los conos son sub-césiles de 8.5 a 11.5 cms de largo 4.5 a 5 cms. de diámetro, las seis bracteas son cuniado u ovalados o lanceoladas, tan largas como la mitad de las escamas o algunas veces excediendolos, son ampliamente redondiosos o truncados o erosolenticuladas en el ápice, la cúspide usualmente excerta, las escamas ampliamente cuniado u ovadas o transverso oblongos de 2.7-5 cms. de ancho y de 1.5 a 2.2 cms. de altura, los márgenes con una pubescencia, pívurilenta en el exterior, las semillas son cuniadas u oxoídes de 8-10 cms. de largo color café pálido, las alas; u ovaladas de 1-1.5 cms. de largo y 1.4-1.5 mm de ancho. (9)

4.7.7. Plagas y Enfermedades.

Abies guatemalensis Rehder. es una especie poco afectada por plagas y enfermedades, pero generalmente pueden ser atacadas por insectos como Dendroctonus sp. cuando está creciendo cerca del Pinus rudis. Otro problema grave son los ataques de Magastigumus sp. que afecta en un 50% la cosecha de conos y semillas (6).

4.7.8. Propagación vegetativa en coníferas:

Los métodos tradicionales de propagación en coníferas, son las estacas, fasciculadas enraizadas y el injerto. Sin embargo existen muchas especies en los cuales la producción de estacas enraizadas es muy difícil, debido a una serie de problemas que varía entre especies y aun entre árboles (10).

Las capacidades actuales de cultivo de tejidos son semejantes a los métodos de enraizamiento de estacas, en el sentido de que la producción de propágulos enraizados es más fácil a partir de materiales juveniles. Las técnicas de cultivo de tejidos se encuentra en un estado más temprano de desarrollo que las de propagación tradicional, sin embargo la aplicación en coníferas y otras especies leñosas, ofrece una alternativa valiosa para su propagación, además como un potencial en la investigación forestal, mejoramiento genético (10).

5. OBJETIVOS:

General:

Determinar la respuesta del (Abies guatemalensis Rehder.) a la propagación vegetativa in vitro, sembrando estacas de hoja y yemas terminales de ramilla, en dos medios de cultivo y seis combinaciones de reguladores del crecimiento.

Específicos:

- Determinar el porcentaje de inóculos que forman callos, sembrando estacas de hoja y yemas terminales de ramilla en los medios MS. modificados y GD modificado suplementado con seis combinaciones de los reguladores del crecimiento, ANA. y BA.
- Determinar el porcentaje de inóculos que forman brotes, sembrando estacas de hoja y yemas terminales de ramilla, en los medios MS. modificado y GD modificado suplementado con seis combinaciones de los reguladores del crecimiento, ANA y BA.
- Determinar el porcentaje de sobrevivencia de los explantes estacas de hojas y yemas terminales de ramilla, sembrados en los medios MS. modificados y GD. modificados, suplementado con seis combinaciones de los reguladores del crecimiento, ANA. y BA.

- Determinar el porcentaje de inóculos que forman plantulas completas, sembrando estacas de hoja y yemas terminales de ramilla, en los medios MS. modificado y GD. modificado suplementado con seis combinaciones de los reguladores del crecimiento, ANA. y BA.

6. HIPOTESIS:

- 6.1. El pinabete (Abies guatemalensis Rehder.) responde a la formación de callos en el proceso de reproducción vegetativa usando la técnica de cultivo de tejidos.
- 6.2. El pinabete (Abies guatemalensis Rehder.) responde a la formación de brotes, en el proceso de reproducción vegetativa usando la técnica de cultivo de tejidos.
- 6.3. El pinabete (Abies guatemalensis Rehder.) responde a una sobrevivencia adecuada en el proceso de reproducción vegetativa usando la técnica de cultivo de tejidos.
- 6.5. El pinabete (Abies guatemalensis Rehder.) responde a la formación de plantas completas en el proceso de reproducción vegetativa usando la técnica de cultivo de tejidos.

7. MATERIALES Y METODOS:

7.1. UBICACION DEL AREA EXPERIMENTAL.

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la subárea de Manejo y Mejoramiento de plantas, Area Tecnológica de la Facultad de Agronomía, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

7.2. MATERIAL VEGETAL.

El material vegetal que se utilizó, se obtuvo en un rodal ubicado en la aldea Los Encuentros, Departamento de Sololá, consistiendo en ramificaciones de donde se obtuvo las estacas de hoja y yemas terminales de ramilla.

7.3. REACTIVOS Y MATERIALES.

Sales minerales, constituyentes del medio de cultivo, agua destilada, hipoclorito de sodio, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, sacarosa, Benciladenina, Acido Naftalenacético, agar. Alcohol al 70%, papel aluminio, papel absorbente.

7.4. CRISTALERIA Y EQUIPO.

Balanza analítica, potenciómetro, autoclave, campana de flujo laminar, refrigerador, agitador magnético, pipetas de 1, 5, 10, 25 ml., probetas de 100, 250 y 500 ml., Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 ml., frascos para almacenar soluciones, gabinete germinador, mecheros, parafilm, agujas de disección, tijeras, bisturí, pinzas, pizetas, cajas de petri de 15x150 mm.

7.5. MEDIOS DE CULTIVO.

7.5.1. Preparación del medio de cultivo.

Para la preparación de los medios de cultivo se prepararon antes las soluciones madre para cada uno de ellos. Se tomó como base la preparación de un litro de medio de cultivo, agregando los ingredientes correspondientes para el medio basal Mursashige y Skoog modificado (A1) y el de Gresshoff y Doll modificado (A2) (Ver Cuadros 2 y 3).

Se prepararon soluciones de concentración conocida, los cuales sirvieron de base para la preparación de los medios. Los medios de cultivo se ajustaron a pH entre 5.6 Y 5.8, con HCl y NaOH al 0.1N.

7.5.2. Esterilización del medio de cultivo.

Luego de preparados los medios de cultivo con sus combinaciones hormonales (Cuadro No. 2) se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 121 grados centígrados y 15 libras de presión.

7.6. SIEMBRA DEL MATERIAL VEGETAL.

7.6.1. Siembra de estacas de hoja. (B1)

Obtenido el material vegetal, se procedió a la selección de las hojas que se utilizaron, para lo cual se utilizó un estereoscopio, seleccionadas las hojas se procedió a obtener la estaca cortando el 60% de la hoja, para utilizar la base de la

misma, luego se esterilizó durante 1 minuto en alcohol al 70% y 15 minutos en una solución al 15% de hipoclorito de sodio, para luego lavarlas en agua destilada y proceder a la siembra respectiva en frascos de 120 ml., que contenían 25 ml. del medio nutritivo correspondiente y las combinaciones hormonales a utilizar.

7.6.2. Siembra de yemas terminales de ramilla. (B2)

Para la obtención de las yemas terminales de ramilla se utilizó ramificaciones jóvenes y se procedió a extraer dicho explante para realizar el procedimiento anterior.

7.6.3. Condiciones de cultivo.

Las siembras se mantuvieron en un cuarto de incubación con un total de 16 horas de luz y una temperatura de 27 ± 2 grados centígrados durante el día y 8 horas-luz con temperatura de 20 ± 2 grados centígrados durante la noche. La provisión lumínica se realizó con lámparas de luz fluorescente.

Cuadro No. 2

COMPOSICION DEL MEDIO BASAL DE MURASHIGE Y SKOOG MODIFICADO

<u>COMPUESTO</u>	<u>mg/litro</u>
NH NO 4 3	825.000
KNO 3	950.000
CaCl .2H O 2 2	220.000
MgSO .7H O 4 2	185.000
KH PO 2 4	85.000
FeSO .7H O 4 2	6.000
Na EDTA 2	7.200
H BO 3 3	3.100
MnSO .4H O 4 2	11.150
ZnSO .7H O 4 2	5.250
KI	0.400
NaMg O .2H O 2 4 2	0.150
CuSO .5H O 4 2	0.013
CoCl .6H O 2 2	0.013
Mio-Inositol	250.000
Tiamina	2.500

Cuadro No. 3

COMPOSICION DEL MEDIO BASAL DE GRESSHOFF Y DOLL MODIFICADO

<u>COMPUESTO</u>	<u>mg/litro</u>
(NH ₄) ₂ SO ₄	200.00
CaCl ₂ · 2H ₂ O	150.00
MgSO ₄ · 7H ₂ O	250.00
KNO ₃	1000.00
KCL	300.00
KI	0.75
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	90.00
NaHPO ₄	30.00
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.80
NaEDTA	37.30
MnSO ₄ · H ₂ O	10.00
ZnSO ₄ · H ₂ O	10.00
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	3.00
H ₃ BO ₃	3.00
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.25
NaMoO ₄ · 5H ₂ O	0.25
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.25
Inositol	10.00
Tiamina HCl.	1.00
Acido nicotnico	0.10
Piridoxina. HCl	0.10

Cuadro NO. 4 COMBINACIONES HORMONALES

Medio Basal	ANA	BA
MS (A1)	0	25 (C1)
MS (A1)	0	50 (C2)
MS (A1)	10	25 (C3)
MS (A1)	10	50 (C4)
MS (A1)	25	25 (C5)
MS (A1)	25	50 (C6)
GD (A2)	0	25 (C1)
GD (A2)	0	50 (C2)
GD (A2)	10	25 (C3)
GD (A2)	10	50 (C4)
GD (A2)	25	25 (C5)
GD (A2)	25	50 (C6)

7.7. DISEÑO EXPERIMENTAL.

7.7.1. Tratamientos.

Los tratamientos que se sometieron a la evaluación fueron:

A1B1C1= Medio MS modificado explante estaca de hoja 0 mM de ANA y 25 mM de BA.

A1B1C2= Medio MS modificado explante estaca de hoja 0 mM de ANA y 50 mM de BA.

A1B1C3= Medio MS modificado explante estaca de hoja 10 mM de ANA y 25 mM de BA.

A1B1C4= Medio MS modificado explante estaca de hoja 10 mM de ANA y 50 mM de BA.

A1B1C5= Medio MS modificado explante estaca de hoja 25 mM de ANA y 25 mM de BA.

- A1B1C6= Medio MS modificado explante estaca de hoja 25 mM de ANA y 50 mM de BA.
- A1B2C1= Medio MS modificado explante yema terminal 0 mM de ANA y 25 mM de BA.
- A1B2C2= Medio MS modificado explante yema terminal 0 mM de ANA y 50 mM de BA.
- A1B2C3= Medio MS modificado explante yema terminal 10 mM de ANA y 25 mM de BA.
- A1B2C4= Medio MS modificado explante yema terminal 10 mM de ANA y 50 mM de BA.
- A1B2C5= Medio MS modificado explante yema terminal 25 mM de ANA y 25 mM de BA.
- A1B2C6= Medio ms modificado explante yema terminal 25 mM de ANA y 50 mM de BA.
- A2B1C1= Medio GD modificado explante estaca de hoja 0 mM de ANA y 25 mM de BA.
- A2B1C2= Medio GD modificado explante estaca de hoja 0 mM de ANA y 50 mM de BA.
- A2B1C3= Medio GD modificado explante estaca de hoja 10 mM de ANA Y 25 mM DE BA.
- A2B1C4= Medio GD modificado explante estaca de hoja 10 mM de ANA y 50 mM de BA.
- A2B1C5= Medio GD modificado explante estaca de hoja 25 mM de ANA y 25 mM de BA.
- A2B1C6= Medio GD modificado explante estaca de hoja 25 mM de ANA y 50 mM de BA.

A2B2C1= Medio GD modificado explante yema terminal 0 mM de ANA
25 mM de BA.

A2B2C2= Medio GD modificado explante yema terminal 0 mM de ANA
50 mM de BA.

A2B2C3= Medio GD modificado explante yema terminal 10 mM de
ANA y 25 mM de BA.

A2B2C4= Medio GD modificado explante yema terminal 10 mM de
ANA y 50 mM de BA.

A2B2C5= Medio GD modificado explante yema terminal 25 mM de
ANA y 25 mM de BA.

A2B2C6= Medio GD modificado explante yema terminal 25 mM de
ANA y 50 mM de BA.

7.7.2. Aleatorización.

Para la ejecución del experimento, se trabajó con 24 tratamientos que se distribuyeron en 5 repeticiones de un diseño completamente al azar con arreglo combinatorio en tres factores, lo que hará un total de 120 unidades experimentales. Los factores evaluados fueron: dos explantes, dos medios de cultivo y seis combinaciones de reguladores de crecimiento. Cada tratamiento consistió en la combinación de los reguladores del crecimiento (ANA y BA) en cada medio basal y el explante correspondiente, utilizándose la aleatorización al azar, al igual que las repeticiones, debido a las condiciones de homogeneidad existentes.

7.7.3. Unidad Experimental.

La unidad experimental consistió en 2 frascos de 125 ml., que contenían 25 ml. del medio y los reguladores del crecimiento correspondientes y cinco explantes/frasco.

7.7.4. Variable Respuesta.

La variable respuesta que se evaluó en el estudio fue el porcentaje de inóculos que formaron callos, el porcentaje de inóculos que formaron brotes, el porcentaje de inóculos que formaron plantas completas, como el porcentaje de sobrevivencia de los explantes por unidad experimental. Para ello se llevó un control a partir de una semana de establecido el experimento, tomando datos cada dos días.

7.7.5 Análisis Estadístico.

El análisis estadístico fue aplicado solamente a la variable respuesta, porcentaje de inóculos que formaron callos pues para las otras variables, no ameritó el mismo, ya que no hubo respuesta tal es el caso de la variable porcentaje de inóculos que formaron plantas completas ó se manifestó solo en un tratamiento, como el caso de la variable, porcentaje de inóculos que formaron brotes.

Es necesario aclarar que inicialmente el experimento fue diseñado con un arreglo trifactorial, sin embargo para la variable porcentaje de inóculos que formaron callos, el explante estaca de hoja no respondió a la misma, teniendo que eliminarse como factor, quedando como una constante el explante yema terminal; por lo tanto el análisis estadístico aplicado a la variable respuesta fue un análisis de varianza (ANDEVA) para un diseño irrestrictamente al azar con arreglo bifactorial, a un 5% de significancia ; quedándose como factores, los medios de cultivo y las combinaciones de los reguladores del crecimiento. Luego de realizado el ANDEVA, se realizó la prueba de TUKEY, para determinar el mejor medio basal y la combinación de reguladores que presentó significancia.

7.7.6. Modelo estadístico.

El modelo estadístico correspondiente al diseño experimental a usar fue el siguiente:

$$Y_{ij} = M + A_j + C_k + AC_{jk} + E_{ij}$$

Donde:

- M = Efecto de la media.
- A_j = j ésima modalidad del factor 1.
- C_k = k ésima modalidad del factor 2.
- AC_{jk} = interacción 1,2.
- E_{ijk} = Error Experimental.

8.2. Análisis de Varianza:

A continuación se presenta el cuadro de ANDEVA, aplicado a la variable callos, que fue la que ameritó dicho análisis estadístico, aclarando que inicialmente se planteó un análisis de un arreglo trifactorial, sin embargo al final de la investigación, del explante, estaca de hoja, no se obtuvo respuesta, teniendo que eliminar ese factor realizando entonces un análisis con arreglo bifactorial. Previo al análisis de varianza los datos fueron transformados para su estandarización.

Fuente de variación	Grados de Libertad.	ANDEVA		F. Calc.	F. Tab.
		Suma de Cuadrados.	Cuadrados Medios.		
Tratamientos	11	22373.33	2033.94	15.85	2.08*
Medio Cultivo	1	8640.00	8640.00	67.22	4.08*
Combinacion Hormonal	5	5913.33	1182.67	9.22	2.45*
Interaccion	5	7820.00	1564.00	12.19	2.45*
Total	59	28533.33			

El coeficiente de variación obtenido es de 67.971.

8.3. Comparación Múltiple de Medias. (Prueba de Tukey, 5% sig).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de ANDEVA, se determinó realizar una prueba de comparación múltiple de medias (Tukey) a la interacción, obteniéndose los siguientes resultados.

Cuadro No. 6 RESULTADOS DEL ANALISIS DE TUKEY

MEDIO	REGULADORES		EXPLANTE	MEDIA	AGRUPAMIENTO
	ANA (mM)	BA (mM)			
MS Mod	10	50	yema terminal	66	a
MS Mod	25	50	yema terminal	44	ab
MS Mod	0	25	yema terminal	26	b
MS Mod	0	50	yema terminal	20	bc
GD Mod	0	50	Estaca de hoja	14	c
MS Mod	10	25	yema terminal	12	c
GD Mod	10	25	Estaca de hoja	8	c
MS Mod	25	25	yema terminal	4	c
GD Mod	0	25	Estaca de hoja	4	c
GD Mod	10	50	Estaca de hoja	2	cd
GD Mod	25	50	Estaca de hoja	0	d
GD Mod	25	25	Estaca de hoja	0	d

El presente estudio, se llevó a cabo en el período de Noviembre a Febrero, meses en los que se alcanza las mas bajas temperaturas, necesarias para la acumulación de horas frío, el cual se cree, influye en el desarrollo fisiológico del Pinabete, de ahí que el explante yema terminal de ramilla, presentó un comportamiento favorable a la variable respuesta porcentaje de inóculos que forman callos, manifestándose en distinto grado, de acuerdo al medio de cultivo y a las combinaciones de reguladores del crecimiento usadas, aunque se notó que se obtuvieron mejores resultados al utilizar el medio de cultivo Murashige y Skoog

modificado. Estadísticamente los tratamientos presentaron significancia y una amplia distribución de los resultados, determinándose que los mejores tratamientos fueron; en primer lugar el explante, yema terminal sembrado en el medio Murashige y Skoog modificado suplementado con 10 mM. de ANA. y 50 mM. de BA. y el explante yema terminal sembrado en el medio Murashige y Skoog modificado suplementado con 25 mM. de ANA. y 50 mM. de BA. en segundo lugar se sitúan los tratamientos, el explante yema terminal sembrado en el medio Murashige y Skoog modificado, suplementado con 25 mM. de BA. y el explante yema terminal sembrado en el medio Murashige y Skoog modificado con 50 mM. de BA. Es importante notar que estadísticamente, los tratamientos que mejor respondieron a la variable respuesta, contenía el medio Murashige y Skoog modificado y que en las combinaciones de reguladores del crecimiento sobresale la concentración de BA. el cual es una citoquinina que promueve la división celular y la organización de callos, pudiendo ser entre otros factores, los que mas influyeron en la formación de callos en el explante yemas terminales de ramilla. Dentro de un mismo tratamiento que respondió a la variable respuesta, existió diferencias en porcentaje de enclallamiento, el cual se atribuye básicamente a la utilización de yema terminal de ramilla sin discriminar los estratos de las ramas utilizadas, para la obtención del explante.

8.4. Figuras de Porcentajes de Supervivencia.

A continuación se presentan las figuras, del comportamiento de la variable, porcentaje de supervivencia de los explantes estaca de hoja y yema terminal en los medios MS. modificado y GD. modificado, con las combinaciones de reguladores del crecimiento ANA. y BA.

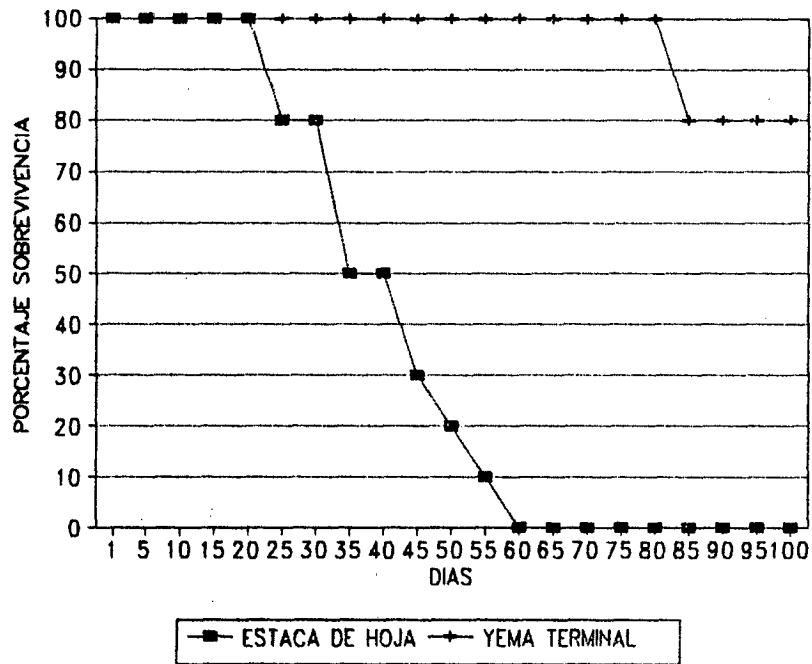


FIGURA 1: Supervivencia de estaca de hoja Vrs. yema terminal en medio MS Mod. 0 mM de ANA y 25 mM de BA.
Fuente: Autor Mayo 1993.

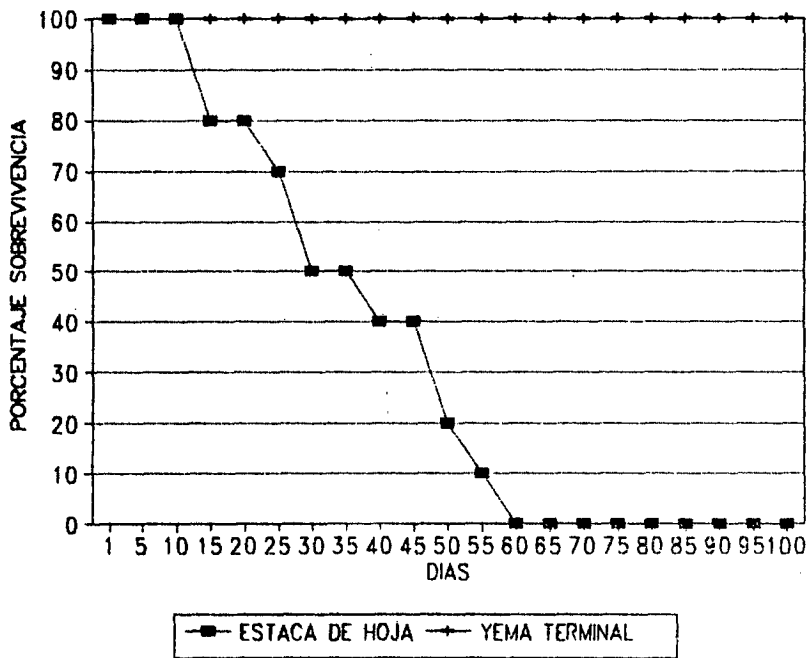


FIGURA 2: Supervivencia de estaca de hoja Vrs. yema terminal en medio MS Mod. 0 mM de ANA y 50 mM de BA.
Fuente: Autor Mayo 1993.

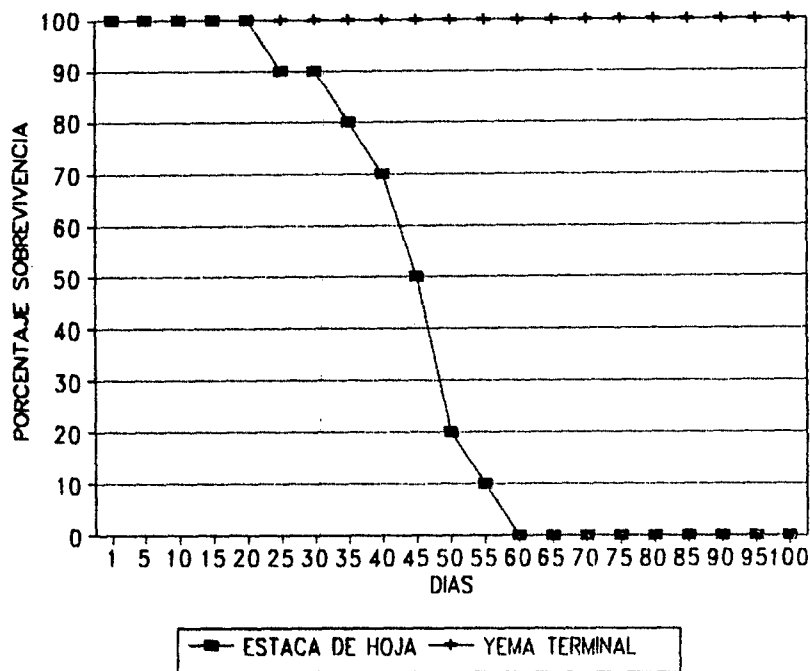


FIGURA 3: Sobrevivencia de estaca de hoja Vrs. yema terminal en medio MS Mod. 10 mM de ANA y 25 mM de BA.
Fuente: Autor Mayo 1993.

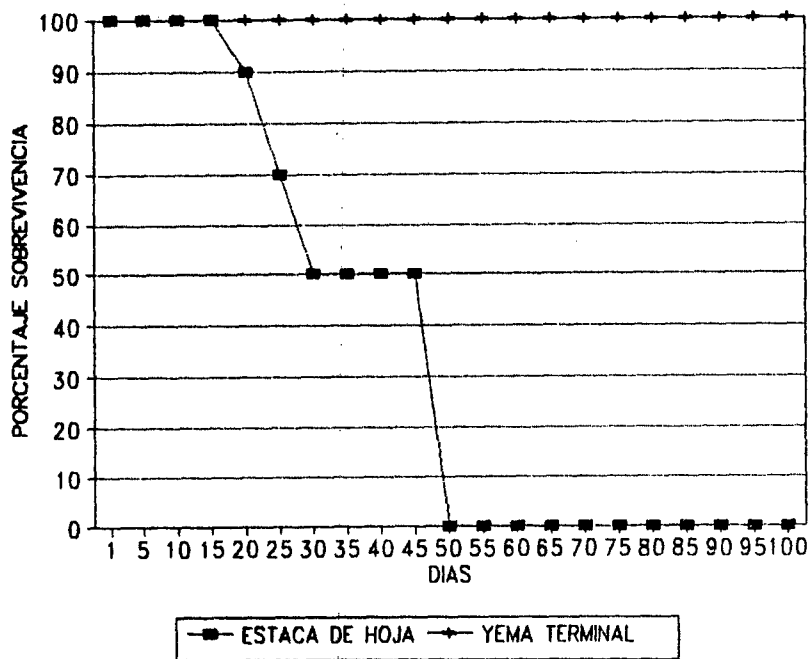


FIGURA 4: Sobrevivencia de estaca de hoja Vrs. yema terminal en medio MS Mod. 10 mM de ANA y 50 mM de BA.
Fuente: Autor Mayo 1993.

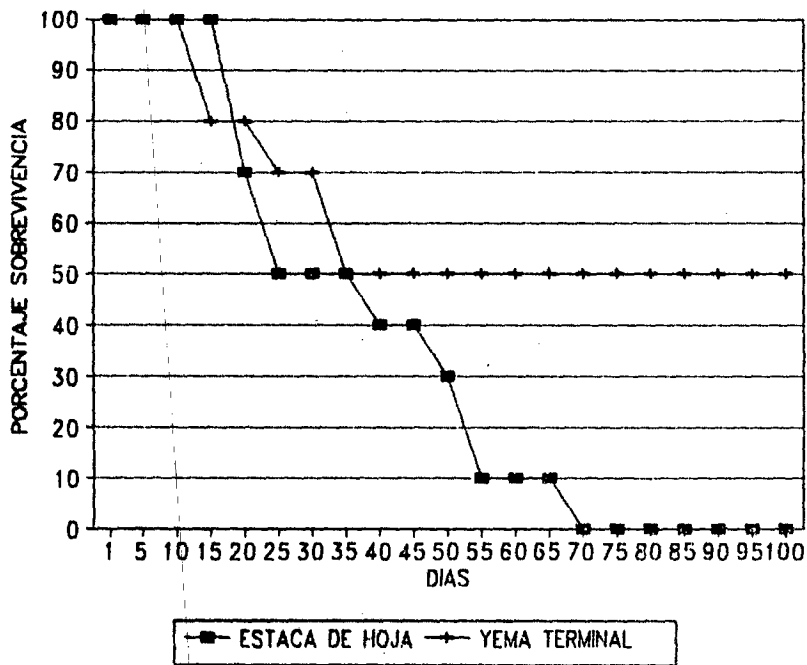


FIGURA 5: Supervivencia de estaca de hoja Vrs. yema terminal en medio MS Mod. 25 mM de ANA y 25 mM de BA.
Fuente: Autor Mayo 1993.

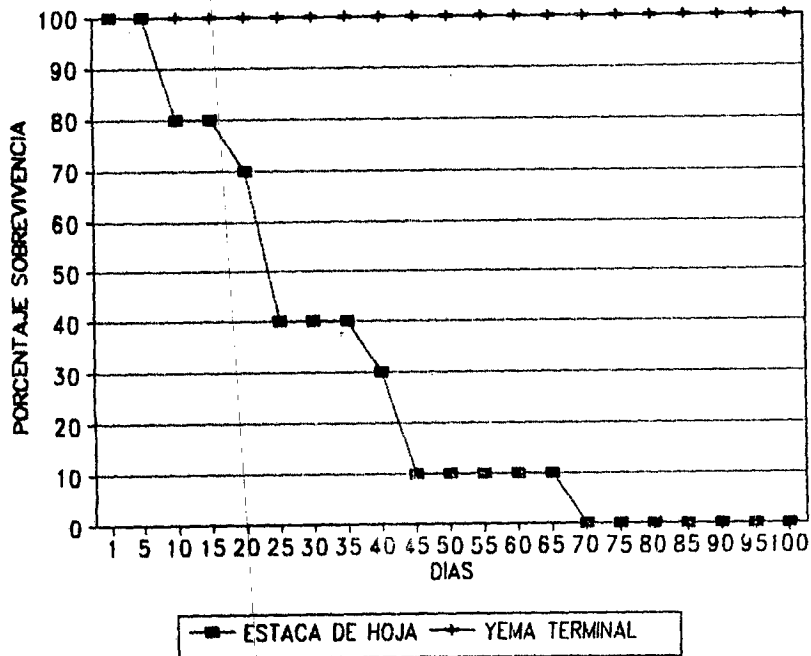


FIGURA 6: Supervivencia de estaca de hoja Vrs. yema terminal en medio MS Mod. 25 mM de ANA y 50 mM de BA.
Fuente: Autor Mayo 1993.

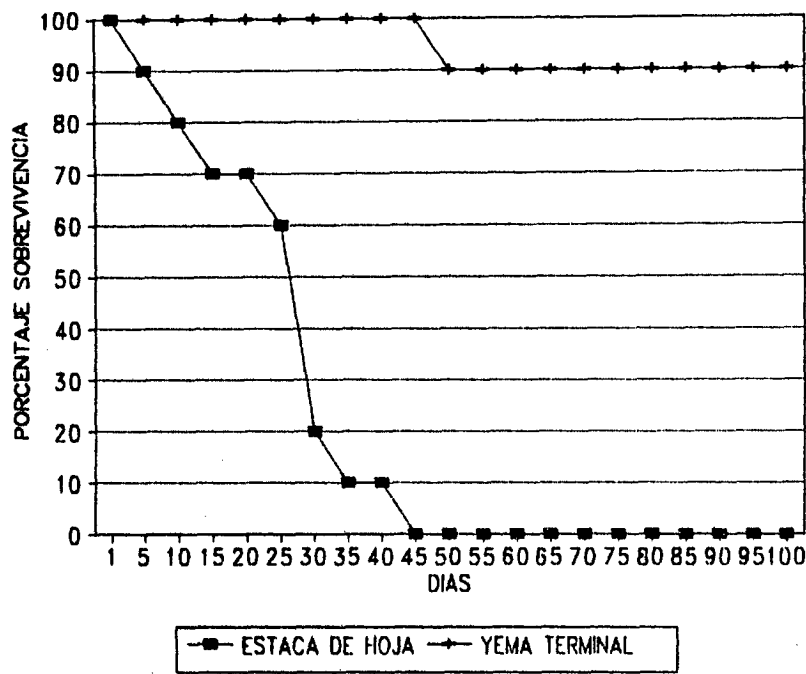


FIGURA 7: Supervivencia de estaca de hoja Vrs. yema terminal en medio GD Mod. 0 mM de ANA y 25 mM de BA.
Fuente: Autor Mayo 1993.

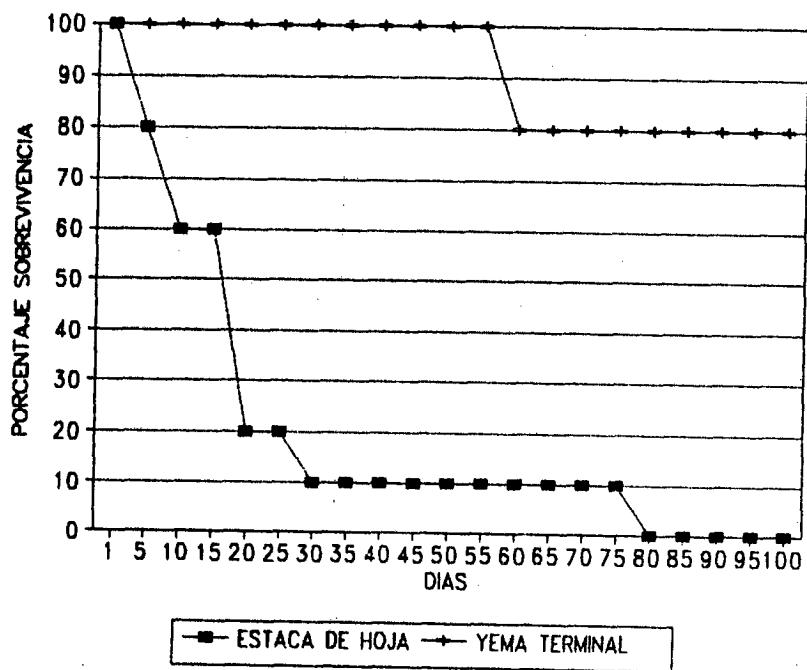


FIGURA 8: Supervivencia de estaca de hoja Vrs. yema terminal en medio GD Mod. 0 mM de ANA y 50 mM de BA.
Fuente: Autor Mayo 1993.

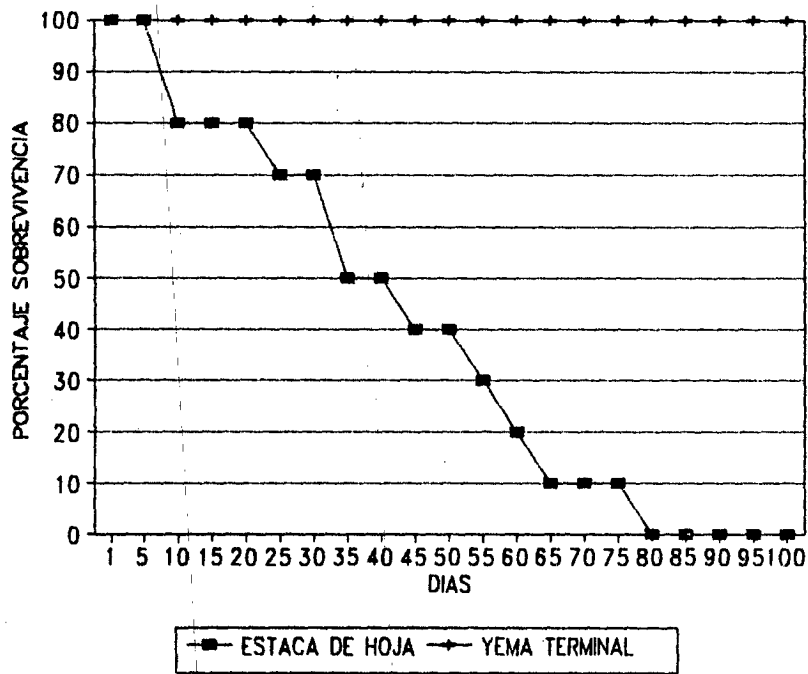


FIGURA 9: Sobrevivencia de estaca de hoja Vrs. yema terminal en medio GD Mod. 10 mM de ANA y 25 mM de BA.
Fuente: Autor Mayo 1993.

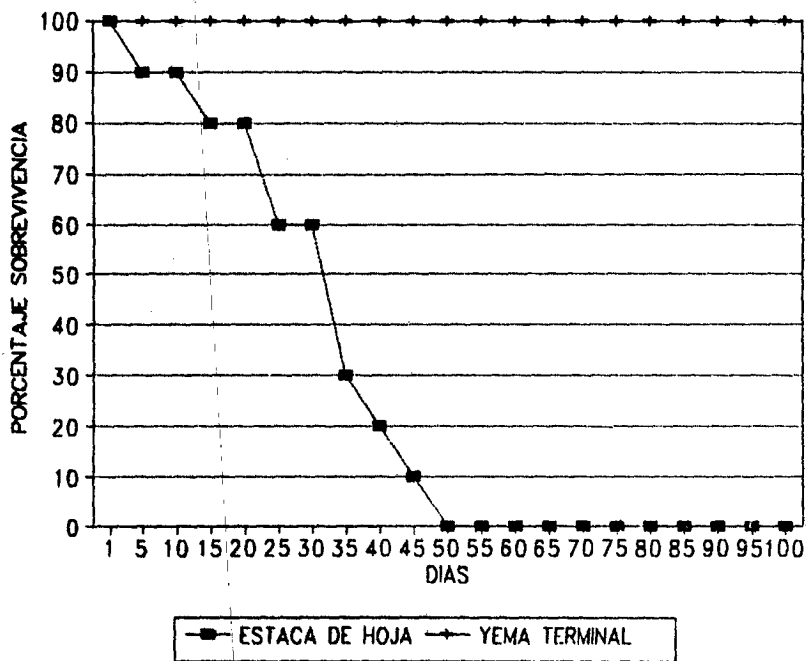


FIGURA 10: Sobrevivencia de estaca de hoja Vrs. yema terminal en medio GD Mod. 10 mM de ANA y 50 mM de BA.
Fuente: Autor Mayo 1993.

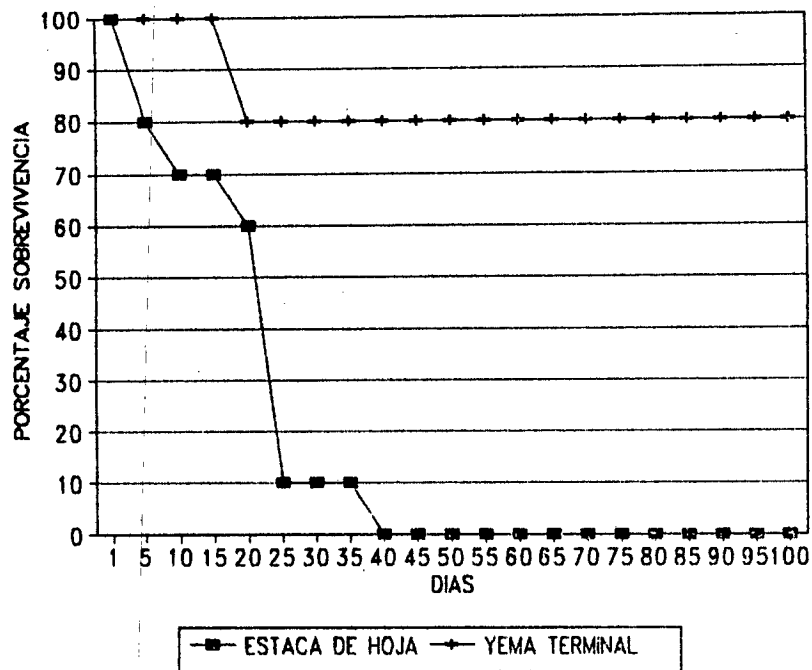


FIGURA 11: Sobrevivencia de estaca de hoja Vrs. yema terminal en medio GD Mod. 25 mM de ANA y 25 mM de BA. Fuente: Autor Mayo 1993.

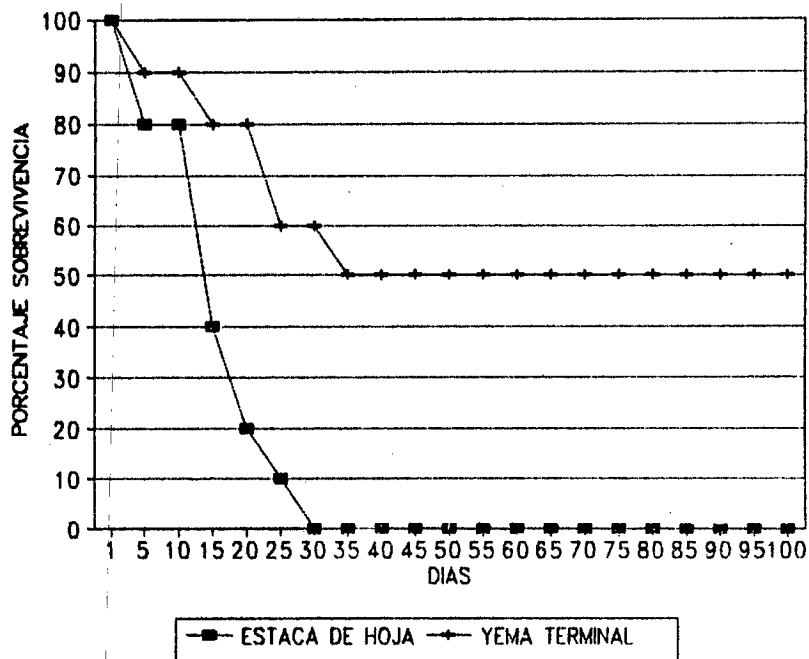


FIGURA 12: Sobrevivencia de estaca de hoja Vrs. yema terminal en medio GD Mod. 25 mM de ANA y 50 mM de BA. Fuente: Autor Mayo 1993.

La variable respuesta, porcentaje de sobrevivencia, de acuerdo a las figuras de líneas presentadas en los resultados (ver figuras 1-12) manifiesta que los explantes tienen una tendencia similar independientemente del medio de cultivo y de la combinación de reguladores del crecimiento. En el caso del explante estaca de hoja, empezó a decaer en el porcentaje de sobrevivencia a partir de los 15 días de sembrada, terminando en la muerte total del explante, teniendo un mínimo de 30 días y un máximo de 80 días de sobrevivencia; este comportamiento se debió quizá, a la poca capacidad del explante a la extracción de los nutrientes del medio de cultivo y de los reguladores del crecimiento respectivos, debido a que el explante consistió en 40% del total de la hoja el cual contenía pocas reservas nutricionales para sobrevivir, é iniciar su proceso fisiológico de elongación y diferenciación celular, si se hubiera utilizado una estaca mas grande ó la hoja completa, es posible que se hubieran obtenido mejores resultados. El explante yema terminal de ramilla, presentó algunos cambios en el porcentaje de sobrevivencia atribuibles a la utilización de yemas demasiado jóvenes que no tuvieron capacidad de desarrollo y a la contaminación que se presentó en un bajo porcentaje, aunque la mayoría de los explantes se mantuvieron vivas hasta la última lectura tomada.

Respecto a la variable respuesta, porcentaje de inóculos que formaron brotes, fue un solo tratamiento el que respondió en un 10% , mientras el resto, no presentó ninguna brotación, al momento de la última lectura. El tratamiento que se manifestó fue el del explante yema terminal sembrado en el medio Murashige y Skoog modificado suplementado con 25 mM. de BA, tomando en cuenta que este regulador del crecimiento es una citoquinina que promueve la formación de brotes y que pudo haber influido en la manifestación de esta variable respuesta, complementado con el alto desarrollo vegetativo del explante.

En el explante estaca de hoja no hubo respuesta favorable en las variables porcentaje de inóculos que formaron callos, brotes y plantas completas; quizá fue debido a la poca capacidad de absorción de nutrientes y reguladores del crecimiento por parte del explante y a la poca capacidad de sus células a la división, elongación y diferenciación celular. El explante yema terminal no respondió favorablemente a la variable porcentaje de inóculos que forman plantas completas, quizá fue porque la dosis de reguladores del crecimiento en las combinaciones no fue la adecuada, ya que aunque se dotó de ANA. al medio, que contribuye a la elongación celular é inducción radicular, esta variable, no se manifestó.

Es importante mencionar que las dosis utilizadas de los reguladores del crecimiento, se basaron en el estudio de Franco (4), que cultivo cotiledones de Pinus oocarpa, sin embargo las mismas demostraron no ser tan efectivas para el pinabete, de ahí

que no se obtuvieron los resultados esperados en la manifestación de las variables evaluadas, debiendo realizar investigaciones de dosis con un rango mas amplio para lograr la respuesta esperada.

9. CONCLUSIONES:

- 9.1. El Pinabete (Abies guatemalensis Rehder.) respondió favorablemente a la formación de callos y a la brotación, en yemas terminales de ramilla, así como una sobrevivencia adecuada aceptando las hipótesis, 6.1, 6.2 y 6.3 planteada.
- 9.2. El pinabete (Abies guatemalensis Rehder.) no respondió favorablemente a la formación de plantas completas, rechazando la hipótesis 6.4 planteada.
- 9.3. Los tratamientos que mejor respondieron a la variable porcentaje de inóculos que formaron callos son: El explante yema terminal de ramilla, sembrado en el medio Murashige y Skoog modificado, suplementado con 10 mM. de ANA y 50 mM. de BA.; El explante yema terminal de ramilla, sembrado en el medio Murashige y Skoog modificado suplementado con 25 mM. de ANA. y 50 mM. de BA.
- 9.4. Dentro de los tratamientos que respondieron a la variable porcentaje de inóculos que formaron callos, las yemas terminales con mejor desarrollo vegetativo presentó mejores resultados.
- 9.5. El tratamiento que respondió, en un 10% a la variable respuesta, porcentaje de inóculos que brotaron fue sembrando yemas terminales en el medio Murashige y Skoog modificado suplementado con 25 mM. de BA.

- 9.6. El explante yemas terminales de ramilla, es el que posee mayor capacidad de sobrevivencia; independientemente de los medios y combinaciones de reguladores del crecimiento.
- 9.7. El explante yema terminal de ramilla, no respondió a la variable respuesta, porcentaje de inóculos que forman plantas completas.
- 9.8. El explante estaca de hoja, no respondió a ninguna de las variable respuesta, en los medios de cultivo y combinaciones de reguladores del crecimiento evaluados.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1. Si se pretende la producción de plantas de Pinabete (Abies guatemalensis Rehder.) partiendo de callos para luego someterlos a un proceso de micropropagación, se recomienda usar los tratamientos; explante de yema terminal de ramilla sembradas en medio Murashige y Skoog modificado suplementado con 10 mM. de ANA. y 50 mM. de BA el explante yema terminal de ramilla sembrada en medio Murashige y Skoog modificado suplementado con 25 mM. de ANA y 50 mM. de BA. Si se desea obtener plantas completas a partir de yemas terminales de ramilla, deberá utilizarse dosis de ANA. y BA. en un rango mas amplio que las usadas en este estudio.
- 11.2. Es recomendable utilizar cualquiera de los dos medios de cultivo evaluados, preferentemente el de Murashige y Skoog modificado.
- 11.4. Se recomienda la generación de una línea de investigación en pinabete, para su reproducción y propagación, contribuyendo así a su conservación.

12. BIBLIOGRAFIA:

1. BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. 1982. Tissue culture in forestry; tissue culture Techniques. Boston, EE.UU., Martinus Nijhoff. 420 p.
2. DODDS, J.H. 1983. Tissue culture of trees; tissue culture of coniferous trees. Westport, Connecticut, The Avipublishing. 147 p.
3. DONAHUE, J.K.; DVORAK, W.S.; GUTIERREZ, E.A.; KANE, M.B. 1985. Abies guatemalensis. North Carolina State University (EE.UU.). Cooperativa de Recursos de Coníferas de Centro América y México. Asuntos Forestales y Tropicales. Boletín no. 3-85. 19 p
4. FRANCO, E.O. 1983. Micropropagation of Pinus oocarpa Shiede and Cupressus lucitanica Miller. Thesis Mag. Sc. Knoxville, Tennessee, EE.UU., Tennessee State University. 74 p.
5. GARCIA RODRIGUEZ, G.R. 1989. Respuesta de la semilla de tres especies forestales (Abies guatemalensis Redher., Tectona grandis L., Juglans guatemalensis Manning) a varios tratamientos pregerminativos. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 37 p.
6. GONZALEZ, J.H. 1979. Caracterización ecológica de las comunidades de pinabete (Abies guatemalensis Rehder.) en Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 79 p.
7. HURTADO, D.V.; MERINO, M.E. 1987. Cultivo de tejidos Vegetales. México, Trillas. 231 p.
8. NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY. 1985. Conservation of conifers and hard woods. Abies guatemalensis two year status report. Estados Unidos de America. Bolletín on Tropical Forestry no. 3. 17 p.

9. STANDLEY, P.; STEYERMAK, J. 1946. Flora of Guatemala. Chicago, Estados Unidos de América, Chicago Natural History Museum. Fieldiana Botany. v. 24, pt. 1,3.
10. VILLALOBOS A., V.M.; THORPE, T.A.; YEUNG, E.C. 1983. Aplicaciones del cultivo de tejidos en especies forestales. Ciencia y Desarrollo. (Mex.) 51: 43-59.



Vo. Bo. Rolando Barrios.



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

Ref. Sem. 017-93

LA TESIS TITULADA: "ESTUDIO DE LA RESPUESTA DEL PINABETE (Abies guatemalensis Rehder) A SU REPRODUCCION VEGETATIVA IN VITRO UTILIZANDO DOS MEDIOS DE CULTIVO, DOS EXPLANTES Y SEIS COMBINACIONES HORMONALES"

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: WALTER ESTUARDO GARCIA TELLO

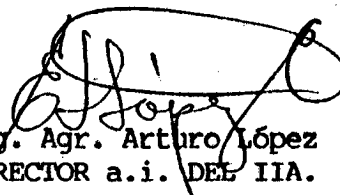
CARNET No: 84-15444

HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Juan José Castillo Mont
Prof. Ernesto Carrillo

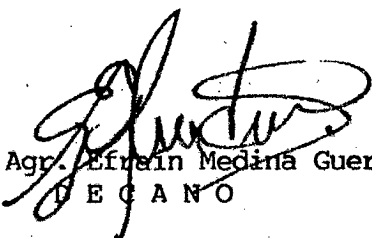
El Asesor y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha cumplido con las normas universitarias y reglamentos de la Facultad de Agronomía, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.


Ing. Agr. Néctor Ramazzini
A S E S O R




Ing. Agr. Arturo López
DIRECTOR a.i. DEL IIA.

I M P R I M A S E


Ing. Agr. Efraín Medina Guerra
D E C A N O



c.c. Control Académico
Archivo.
/pr.

APARTADO POSTAL 1545 • 01901 GUATEMALA, C. A.
TELEFONO: 769794 • FAX (5022) 769675