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

EVALUACION DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA INDUCCION DE CALLO Y REGENERACION DE PLANTAS EN EMBRIONES INMADUROS DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) EN LAS VARIEDADES CHOCOYO Y XEQUIJEL.

T E S I S

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA

FACULTAD DE AGRONOMIA

P O R

SERGIO ANTONIO RAMOS SIERRA

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO

I N G E N I E R O A G R O N O M O

EN SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA

EN EL GRADO ACADEMICO DE

L I C E N C I A D O

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 1994

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

DOCTOR JAFETH ERNESTO CABRERA FRANCO

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	PROF. GABRIEL AMADO ROSALES
VOCAL QUINTO	BR. AUGUSTO SAUL GUERRA GUTIERREZ
SECRETARIO	ING. AGR. MARCO ROMILIO ESTRADA MUY

Guatemala, noviembre 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 tésis titulado: "EVALUACION DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA INDUCCION DE CALLO Y REGENERACION DE PLANTAS EN EMBRIONES INMADUROS DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) EN LAS VARIEDADES CHOCOYO Y XEQUIJEL"

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

Respetuosamente,

Prof. Sergio Antonio Ramos Sierra

ACTO QUE DEDICO

A: DIOS

Benedicto Antonio Ramos Cruz
Flora Aída Sierra De Ramos
Mis padres
Como muestras de mi agradecimiento.

Marco Vinicio
Leonel Fernando, Miriam Regina, Gabriela Valentina
Mis hermanos.

Maura Nohemí Colindres De Ramos
Mi esposa
Por la comprensión y colaboración que siempre
me ha dado.

Sergio Antonio José
Oscar Iván
Mis hijos
Con todo mi amor.

Reginalda Cruz Viuda De Ramos
Francisco Antonio Ramos
José Alberto Sierra
Romelia Baldizón De Sierra
Mis abuelitos
Con amor.

Mis Tios y Tias

Mis suegros

Mis familiares, en general

Mis amigos.

TESIS QUE DEDICO

A: Guatemala, como un aporte al desarrollo agrícola del pais.

Junta Directiva "Camposanto La Colina"

Lic. Luis Pellecer y Arq. Oscar Ascoli.

Señoras Isabel y Diana Canella.

Magisterio Nacional.

Facultad de Agronomía.

Mis compañeros y amigos en especial a:

Enrique Antonio Licona
Mario Daniel Aguilera
Isidro Miranda
Boris Papa
Rolando Barahona
José De León Robles
César Marroquín Varela
David Pivaral González
Javier Ramos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a:

- Ing. Agr. Edgar Oswaldo Franco Rivera, por su asesoría, revisión y corrección del presente trabajo de tesis.
- Ings. Agrs. Domingo Amador, José Humberto Calderón y Héctor Ramazzini, por su colaboración y observaciones hechas al presente trabajo
- Ings Agrs. Victor Alvarez y Marino Barrientos, por su asesoría en la interpretación estadística.
- Al personal de campo del Centro Experimental Docente de Agronomía, por su colaboración en la etapa de campo.
- Al personal del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía.

CONTENIDO

/.. contenido

LISTADO DE CUADROS

LISTADO DE APENDICES

Apendice No.

ABREVIATURAS

AIA	ACIDO INDOLEACETICO
ANA	ACIDO NAFTALENACETICO
MS	MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE Y SKOOG
N6	MEDIO DE CULTIVO N6
PAPA II	MEDIO DE CULTIVO CON EXTRACTO DE PAPA

EVALUACION DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA INDUCCION DE CALLO Y REGENERACION DE PLANTAS EN EMBRIONES INMADUROS DE TRIGO (Triticum aestivum L.) EN LAS VARIEDADES CHOCOYO Y XEQUIJEL.

MEDIA CULTURE EVALUATION FOR CALLUS INDUCTION AND PLANT REGENERATION FROM INMATURE EMBRYOS OF WHEAT (Triticum aestivum L.) VARIETES CHOCOYO AND XEQUIJEL.

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó la respuesta de los embriones inmaduros de las variedades de trigo Chocoyo y Xequijel a la inducción de callo y regeneración de plantas in vitro.

Los medios utilizados para evaluar la respuesta a la inducción de callo de los embriones inmaduros fueron N6, MS y Papa II los cuales se utilizaron sólidos (gelificados) y suplementados cada uno con los reguladores del crecimiento Acido Naftelenacético (ANA), 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y Kinetina en ocho combinaciones.

Los cultivos se incubaron a temperatura de 28° Centígrados en la obscuridad por un período de 14 días, luego del cual los callos obtenidos se tranfirieron a medios sólidos de regeneración de plantas. Estos estuvieron constituidos por el medio Murashige y Skoog (MS), suplementado con ácido indolacético (AIA) en concentraciones de 0.5 mg/l y Kinetina en concentración de 1 mg/l. Los callos en medios de regeneración de plantas se mantuvieron bajo luz continua a temperatura de 28° Centígrados durante 4 semanas.

La mayor respuesta en la inducción de callo se obtuvo con las dos variedades de trigo, Chocoyo y Xequijel utilizando cualesquiera de los medios basales N6, MS y Papa II, suplementados con 2 mg/l de 2,4-D mas 0.5 mg/l de ANA.

No se logro obtener regeneración de plantas a partir de los callos inducidos, habiendose usado el medio basal Murashige y Skoog y los reguladores del crecimiento Kinetina a una concentración de 1 mg/l y AIA a una concentración de 0.5 mg/l.

I. INTRODUCCION

El trigo (Triticum aestivum L.), es junto al frijol y maíz la base de la alimentación en la dieta de la población Guatemalteca. El cultivo es afectado por plagas y enfermedades, las cuales limitan su rendimiento. El incremento de este es de fundamental importancia y puede lograrse mediante el uso de técnicas de mejoramiento modernas, creando variabilidad en variedades ya establecidas. Dentro de las técnicas de mejoramiento de plantas, actualmente se está desarrollando el mejoramiento in vitro, que contempla el cultivo de partes de plantas (hojas, tallos, yemas, meristemos), el cultivo de anteras, cultivo de embriones e ingeniería genética.

Con el cultivo de embriones inmaduros, se puede crear variabilidad y mejorar las características de rendimiento, resistencia de plagas, enfermedades y otras que se deseen mejorar en el trigo.

Con ello se puede lograr el incremento de la producción nacional al contar con variedades más rendidoras y con características deseables.

En este trabajo se reporta la evaluación de la respuesta de dos variedades de trigo a la inducción de callo y regeneración de plantas utilizando diferentes medios de cultivo a partir de cultivo de embriones inmaduros, siendo las variedades evaluadas: Chocoyo y Xequijel.

Se utilizaron las variedades Chocoyo y Xequijel por su adaptación al altiplano de Guatemala. El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Centro Experimental Docente e Invernadero de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

2. HIPOTESIS

1. Las dos variedades de trigo a evaluar tienen la misma capacidad para inducir callo a partir de embriones inmaduros y regenerar plantas independientemente de los medios de cultivo.

2. Existe al menos un medio de cultivo en el cual se obtendrá una alta frecuencia en la inducción de callo y regeneración de plantas.

3. OBJETIVOS

1. Evaluar la respuesta de las variedades de trigo Chocoyo y Xequijel a la inducción de callo a través del cultivo de embriones inmaduros.

2. Evaluar la respuesta de los callos inducidos de las variedades Chocoyo y Xequijel a la regeneración de plantas.

3. Evaluar el efecto de medios de cultivo en la inducción de callo en embriones inmaduros de las variedades de trigo Chocoyo y Xequijel.

4. Evaluar el efecto de medios de cultivo a la regeneración de plantas a través de callos inducidos de las variedades de trigo Chocoyo y Xequijel.

4. REVISION BIBLIOGRAFICA

1. Cultivo del trigo (Triticum aestivum L.)

1.1 Importancia del cultivo

El cultivo del trigo es uno de los más importantes, pues este cereal, el maíz y el arroz constituyen la base agrícola del mundo.

Con el aumento de la población y los progresos de la ciencias agronómicas, su cultivo se ha ido difundiendo cada vez más por los países de todos los continentes, sobre todo en América del Norte, ya que en los Estados Unidos y en el Canadá se cultivan grandes extensiones. Rusia, Canadá, México, Argentina, Australia, Nueva Zelanda, India, España, Francia e Italia son los paises que mayor cantidad de trigo producen (5).

1.2 Origen del cultivo

De la hipótesis acerca del origen del trigo, la mas aceptada es la de De Candolle, quien indica que es originario de Asia Occidental, de las regiones próximas al Eufrates, donde crecía expontaneamente en épocas remotas y se han encontrado hace poco tiempo plantas de trigo silvestre.

Su cultivo se remonta hasta antes de la Era cristiana, pues fué de los primeros cultivos que doméstico el hombre. Por facilidad de su cultivo y su fácil aprovechamiento como alimento se incrementó en todo el mundo.

Los chinos lo cultivaron 2,800 años antes de Jesucristo, en Egipto se cultivaba hace más de 4000 años; en Hungría era conocido entre los pueblos más antiguos; según antecedentes. También se conocía por los Iberos de tal manera que desde hace mucho tiempo, el trigo se cultivaba en una zona inmensa, que se extiende desde la China hasta la Peninsula Ibérica.

En Guatemala lo introdujeron los españoles y su cultivo se dispersó por diversas zonas agrícolas de la república y en la actualidad hay regiones perfectamente definidas en las que se cultiva el trigo. (5).

2. Zonificación del cultivo

Guatemala cuenta con áreas aptas para el cultivo del trigo. Las áreas de mayor importancia en producción están enmarcadas en los departamentos de: Chimaltenango, Quetzaltenango, San Marcos, Sololá, Totonicapan, Huehuetenango y Quiché. (En el cuadro 1 se puede ver la producción nacional de trigo por departamento).

Su cultivo en parcelas pequeñas de tierra hace que existan aproximasamente 44,848 fincas las cuales para 1986 tuvieron una superficie sembrada de 26929 hectáreas. (8).

Potencialmente se cuenta con unas 70000 hectáreas que comprenden los departamentos de: Quetzaltenango, San Marcos, Sololá y Totonicapan para el cultivo de trigo (actualmente con maíz) esto resultaría en la autosuficiencia de trigo para la producción del pan para los guatemaltecos. (En el cuadro 2 se puede ver el area, producción y rendimiento de trigo a nivel nacional).

3. Cultivo de tejidos

Las primeras experiencias para mantener vivos órganos aislados se realizaron hace más de 130 años con segmentos de cola de renacuajo.

Los primeros trabajos en cultivo <u>in vitro</u> se deben al alemán Haberlandt, fisiólogo vegetal, quien lo anunció por primera vez en 1902.

Haberlandt logró mantener vivo durante varios meses, sin multiplicación celular un conjunto de células (fragmentos de tejidos vegetales) utilizando un medio de Knop mejorado.

En 1902, Alexis Carrel obtuvo un cultivo indefinido de células de corazón de embrión de pollo.

En 1922, W. J. Robbins y W. Kott conservaron un cultivo de apices de raíz durante 6 meses (los fragmentos crecieron algunos milímetros hasta

CUADRO 1 . Producción y rendimiento nacional del cultivo de trigo año 1,992.

Departamento	Superficie (ha)	Producción (toneladas métricas)	Ton/ha
Quetzaltenango	3962.09	9006.73	2.27
Totonicapan	2389.43	3980.44	1.65
Chimaltenango	1558.63	2747.16	1.76
San Marcos	1664.84	2856.27	1.71
Huehuetenango	664.27	1842.91	2.77
Sololá	431.28	1100.73	2.28
Sacatepéquez	52.93	144.79	2.73
Quiché	69.87	122.01	1.74
Jalapa	376.03	917.26	2.43
Guatemala	9.60	31.61	3.29
Santa Rosa	0.00	0.00	0.00
Baja Verapaz	0.00	0.00	0.00
Jutiapa	0.00	0.00	0.00
Totales	11228.97	22749.91	22.64

FUENTE: Gremial de Trigueros.

CUADRO 2. Area, producción, rendimiento de trigo en Guatemala

período: 1979-1980- 1992-93

Año agricola 1/	Area cosechada (miles de ha)	Producción (miles en T. M.)	Rendimiento (ton/ha)
1979/80	31.5	57.44	1.8
1980/31	31.5	45.35	1.4
1981/82	31.5	41.49	1.3
1982/83	29.65	42.00	1.4
1983/84	33.18	54.4	1.6
1984/85	32.2	49.38	1.5
1985/86	31.5	68.00	2.2
1986/87	32.2	53.00	1.6
1987/88	33.6	54.4	1.6
1988/39	28.42	42.8	1.5
1989/90	19.26	32.0	1.7
1990/91	15.19	22.6	1.5
1991/92	15.19	21.9	1.4
1192/93	14.00	19.9	1.4

FUENTE: Instituto Nacional de Estadística, Gremial Nacional de Trigueros Y Banco de Guatemala.

1/ Comprende el período diciembre de una año a noviembre del siguiente.

5-6 cm.) (14)

P. R. White obtuvo por primera vez el cultivo de ápices de raíces de tomate in vitro utilizando para ellos medio líquido con sales minerales, extracto de levadura y azúcar; debido al éxito logrado se hicieron más esfuerzos con cultivos de tejido vegetal. (14)

En 1934, R.J. Gautheret obtuvo a partir de tejidos de meristemos una proliferación de tejidos, pero sólo por 8 meses. En 1939, el mismo investigador obtuvo un cultivo indefinido de tejidos de zanahoria.

El mismo año Nobecourt, con el mismo tejido vegetal y White, con tejidos de tabaco, obtuvieron resultados semejantes. (14)

Después de 1939, una segunda etapa importante fué la obtención de plantas sanas por eliminación de virus, a partir de cultivo de meristemos.

El descubrimiento de las citokininas y del control de la regeneración de tallos y raíces, logradas en callo de tabaco por Skoog y sus colaboradores en 1948 en la Universidad de Wisconsin estableció las bases para manipular la iniciación de órganos y proporcionó el principio en que se basa la micropropagación. Otro avance importante fue el logro de regeneración de estructuras de tipo embrión (embriones somáticos o embrioides) de suspensiones de células de callo.

Las técnicas de cultivo fueron avanzando a medida que mayor información sobre reguladores del crecimiento estaba disponible. (5).

Al comienzo de los años 60 se descubrió que la leche de coco estimulaba el crecimiento de los embriones de Datura, además se demostró que la auxina sintética 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) promovia la división de células en especies vegetales que antes presentaban dificultades para hacerles crecer en medios de cultivo. (5).

Skoog, descubrió que el callo del tabaco proliferaba cuando se cultivava en un medio que tenía como uno de sus ingredientes una muestra vieja de ADN proveniente de semen de pescado. El componente activo responsable de este crecimiento prolífico fue la 6-furfurilpirina a la que se le dió el nombre de "cinetina" por su capacidad de inducir la división de células.

Cuando se agregó cinetina a los medios de cultivo, fue posible inducir la formación y proliferación de callos de un gran número de especies vegetales.

Skoog Y Miller, lograron que las células de callos desarrollaran raíces y yemas en cultivo de tejidos de tabaco. Ellos comprobaron que la diferenciación en raíces o yemas dependía de la proporción entre cinetina y auxina en el medio de cultivo, demostrando así la importancia de la composición del sustrato. (16).

Murashige y Skoog, publicaron un trabajo sobre la composición de un medio de cultivo de tejidos de tabaco, que posteriormente fué útil para muchas especies de plantas. (16).

En los años 60, se logró en muchas especies el desarrollo de plantas haploides a partir de granos inmaduros de polen mediante el cultivo de anteras y la regeneración de plantas a partir de protoplastos, la totipotencia de una célula vegetal aislada quedó finalmente provada. (16)

4. Cultivo de embriones

El embrión de la semilla puede ser aislado y puesto a germinar en un medio que permita su desarrollo para formar una planta. Este proceso es útil ya que permite la rápida producción de plántulas provenientes de semillas con baja viabilidad o con problemas de incompatibilidad. (24).

El cultivo de embriones maduros de café ha permitido obtener un gran número de plantas, de algunos materiales valiosos, a partir de unas pocas semillas. Una vez que estos han germinado, y se tiene una planta de tamaño

adecuado, se inicia la fase de multipliación por la técnica de microestacas. (24).

El cultivo de embriones inmaduros de "Catimor" T8664 y Caturra" T2308 y sus respectivos cruces permitió determinar que es posible obtener plantas normales de café a partir de embriones aislados a los 20, 22 y 24 semanas después de la floración. (24).

El cultivo de embriones en estados inmaduros requiere condiciones que estimulen una embriogénesis continuada en vez de germinación precoz. Estas condiciones pueden incluir concentraciones elevadas de sucrosa, hidrolizado de caseína, agua de coco y glutamina en el medio.

La presión osmótica elevada estimula el desarrollo, pero puede o no ser esencial. El nitrógeno en formas reducidas (amoniacales o aminas) es necesario. El papel de las hormonas reguladoras en el desarrollo de las semillas ha sido bien reconocido, pero su empleo en cultivos asépticos no está claro. Es posible que resulte necesario probar combinaciones de ácido giberélico, ácido abscísico y citokinina.

El ácido abscísico desempeña un papel de importancia particular en la regulación del desarrollo de embriones in vitro. El enfriamiento a 2°C de embriones parcialmente desarrollados durante 1 a 3 meses, ha estimulado la germinación normal en especies de Prunus. (25).

En una etapa más avanzada del desarrollo del embrión cuando tiene la mitad a su tamaño normal, puede ser adecuado un medio simple que contenga sólo sucrosa y minerales. Es aconsejable disminuir las concentraciones de sucrosa al avanzar el desarrollo. (18).

El cultivo de embriones también es útil para inducir la pronta germinación de semillas maduras en letargo y acortar con ello el ciclo de vida. (17).

Los embriones de las semillas han sido utilizados como explantes para la iniciación de callo. En efecto los tejidos del embrión por su caracter juvenil son potencialmente meristemáticos. Inclusive, las células del callo que se logra formar a partir de embriones, forman, en muchos casos, nuevos embriones que pueden generar un embrión por lo que el número de plantas obtenido por un callo es muy elevado. A este proceso (formación de embriones a partir de células somáticas) se le ha dado el nombre de embriogénesis somática, y a los embriones obtenidos por esta vía el nombre de embrioides para diferenciarlos del embrión zigótico. (7).

4.1 Estudios realizados en Guatemala con cultivo de anteras de trigo.

Alvarez Valenzuela (1992), evaluando la respuesta a la inducción de callo y regeneración de plantas en cinco genotipos de trigo (Triticum aestivum L.) a través del cultivo de anteras y utilizando los medios de cultivo N6 y Papa II, obtuvo los resultados que se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Efecto de dos medios basales y cinco combinaciones hormonales sobre la inducción de callo de la variedad ICTA Comalapa (Alvarez Valenzuela 1992).

Medio Basal	Combinación Hormonal		Formación de callo
	2,4-D (mg/l)	ANA	(%) *
N6 - 1	0.0	0.0	0.0
N6 - 2	2.0	0.0	0.33
N6 - 3	0.0	2.0	1.00
N6 - 4	2.0	0.5	1.33
N6 - 5	0.0	2.0	3.66
Papa II - 1	0.0	0.0	0.33
Papa II - 2	2.0	0.0	1.33
Papa II - 3	0.0	2.0	2.33
Papa II - 4	2.0	0.5	0.66
Papa II - 5	0.5	2.0	1.00

$$* \% \text{ Formación de callo} = \frac{\text{No. de anteras que forman callo}}{\text{Total de anteras sembradas}} \times 100$$

Es importante señalar que de los cinco genotipos evaluados, unicamente la variedad ICTA Comalapa dió respuesta a la inducción de callo. Las otras variedades evaluadas y que no respondieron positivamente fueron: ICTA Sara, ICTA Zaragoza, Nariño 59 y la linea Moris Imuri. (1).

Los resultados que se obtuvieron en el trabajo indicado anteriormente, en cuanto a regeneración de plántulas se muestra en el cuadro 4.

Cuadro 4. Regeneración de plantas usando callos provenientes de anteras para la variedad ICTA Comalapa. (Alvarez Valenzuela 1992).

Medio de Origen	Medio de regenere-ción	Plantas Totales regenerada (%) *	Plantas Regeneradas verdes (%)	Plantas Regeneradas albinas (%)
N6 - 5	MS basal	170	76.47	23.53
Papa II - 3	MS + (1 mg/l BA + 0.5 mg/l AIA)	60	66.66	33.33

$$* \text{ Plantas Tot. Reg. } \% = \frac{\text{No. de plantas regeneradas}}{\text{No. de callos sembrados}} \times 100$$

Vale la pena indicar que en el cuadro anterior se muestran porcentajes de regeneración de plantas mayores del 100 %, debido a que algunos callos regeneraron más de una planta completa.

Por su parte Calderón Diaz (3), evaluando 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 del cultivo de anteras, obtuvo los resultados que se resumen en el cuadro 5 y que incluye únicamente aquellos tratamientos que presentaron respuesta.

Es importante indicar que los mejores resultados se obtuvieron con la variedad de trigo Chocoyo, cuando se usó medio basal Papa II suplementado con

0.5 mg/l de 2,4-D + 2.0 mg/l de ANA, se obtuvo 24.3 % de formación de callo y cuando se usó el medio basal N6 suplementado con 2.0 mg/l de 2,4-D + 0.5 mg/l de ANA, el porcentaje de callo fué del 23.3 %.

Cuadro 5. Resumen de los resultados obtenidos en las variedades de trigo Patzún, Chocoyo y Xequijel en los medios de inducción de callo y de regeneración de plantas. (Calderón Díaz 1990).

Variedad	Medio de inducción de callo: Medio basal	Reguladores del crecimiento: 2,4-D (mg/l)	Reguladores del crecimiento: ANA (mg/l)	Producción de callo %
Patzún	N6	0.0	2.0	3.0
	N6	2.0	0.0	2.3
	Papa II	0.5	2.0	1.0
Chocoyo	Papa II	0.5	2.0	24.3
	N6	2.0	0.5	23.3
	Papa II	2.0	0.0	16.0
	Papa II	2.0	0.5	16.0
	Papa II	0.0	2.0	11.0
	N6	0.0	2.0	8.3
	N6	0.0	0.0	0.3
Xequijel	N6	0.0	2.0	1.3
	N6	2.0	0.0	1.0
	Papa II	0.5	2.0	1.0
	Papa II	2.0	0.0	0.3
	N6	0.5	2.0	0.0

Medio de regeneración

Variedad	Medio Basal	Reguladores del crecimiento: AIA (mg/l)	Reguladores del crecimiento: BA (mg/l)	Regeneración de plantas: verdes %	Regeneración de plantas: albinas %
Patzún	MS	0.0	0.0	61.53	38.47
	MS	1.0	0.5	66.66	33.34

5. Cultivo de callo

El callo es producido en los explantes *in vitro* como resultado de las lesiones y en respuesta a hormonas ya sea endógenas o proporcionadas en el medio de cultivo.

Los explantes de casi cualquier estructura o parte de planta, como semillas, tallos, raices, hojas, órganos de almacenamiento o frutos pueden ser separados, desinfectados y colocados en la superficie de un medio de cultivo para producir callo. (14)

Para el cultivo de callo se han usado varios medios de cultivo diferentes, pero el más común es el medio Murashige-Skoog (MS), desarrollado especialmente para callo de tabaco. Este medio es rico en macroelementos, en particular nitrógeno, incluyendo iones tanto de nitrato (NO_3) como de amonio (NH_4), sucrosa y ciertas vitaminas. (14)

La iniciación de la división celular y la subsiguiente producción de callo requieren que se adicionen en las proporciones adecuadas citokininas y una auxina. La auxina, en concentraciones de moderadas a elevadas, es la hormona primaria que se usa para producir callo. Las principales auxinas incluyen el ácido indolacético (IAA), ácido naftanelacético (ANA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), en orden creciente de efectividad. (14)

Aunque exteriormente los cultivos de masas de callo pueden aparecer como masas de células uniformes, en realidad su estructura es relativamente compleja con considerable variación morfológica, fisiológica dentro del callo. El cracimiento sigue un patrón logarítmico típico, presentandose: (a) un período lento de inducción de división celular que requiere auxinas, (b) una fase de división celular rápida que implica la síntesis de ADN, ARN y proteina, seguida por (c) una disminución gradual de la división celula con diferenciación

en células de parenquima más grandes y en células de tipo vascular. La división celular no se efectúa en todo el callo sino que se localiza principalmente en una capa meristemática en la periferia exterior.

Las partes interiores del callo permanecen como una masa no dividida del tejido viejo, a su tiempo, puede diferir fisiológicamente y genéticamente de las células de la capa exterior; en la cual la división diminuye y el callo puede tomar un aspecto bulboso a medida que las divisiones celulares restringen a grupos específicos de células. (14)

Dentro de las masa de tejidos en cultivo pueden ocurrir variaciones en edad y tipo de células. La células interiores son más viejas y las exteriores más nuevas en tanto persista una región meristemática en la periferia de la masa de callo.

6. Medios de cultivo.

Es una solución que contiene sales minerales, elementos orgánicos (Vitaminas, aminoácidos, algún carbohidrato, generalmente sacarosa) y reguladores del crecimiento.

El éxito del cultivo *in vitro* depende en gran parte del medio de cultivo. Este es uno de los factores más importantes que controlan el crecimiento y la morfogénesis de los tejidos vegetales en cultivo.

A través del tiempo, paralelo al desarrollo y perfeccionamiento de la técnica del cultivo de tejidos se han establecido diferentes medios de cultivo.

Con ellos se definió la especificidad de medios, hoy día se puede afirmar que para cada género, incluyendo diferentes explantes que provienen de la misma planta tienen diferentes requerimientos para crecer en óptimas condiciones. Estos medios básicos se denominan, generalmente, con el nombre de las personas que los desarrollaron. Los primeros medios fueron establecidos con base en las soluciones nutritivas para cultivos hidropónicos de Knop y Pfeffer.

Sobre esa base surgieron los medios de White y de Gautheret. Estos medios si bien permiten el crecimiento de callo y raíces, son demasiado pobres para favorecer el desarrollo de otras partes de las plantas. (25)

6.1 Algunos medios de cultivo

6.1.1 Murashige y Skoog.

Este medio de cultivo se ha utilizado con mucho éxito en muchas especies, a veces con ligeras modificaciones. Tiene concentraciones elevadas de nitrato de amonio, por eso es de uso corriente en el cultivo *in vitro* de café. Es probablemente el medio más utilizado actualmente.

6.1.2 Medio Schenk y Hildebrendt

Empleado para el cultivo *in vitro* de callos, tanto en monocotiledoneas como en dicotiledoneas.

6.1.3 Medio N_6

Lapham, afirma que una alta concentración de iones de amonio inhiben la formación de callo en polen de trigo y arroz respectivamente. Basado sobre estos resultados se ha desarrollado un nuevo medio N_6 por considerarse que reduce la concentración de iones del medio y regula la relación óptima entre amonio nitrogenado y nitrato-nitrógeno. Está provado que el medio N_6 es más eficiente que otros medios sintéticos para el cultivo de anteras de arroz y otros cereales incluyendo el trigo. (25)

6.1.4 Desarrollo de medio de papa

Extractos naturales de papa, camote, ñame, tomate, endospermo de arroz y maíz, cuando el grano ha empezado a llenar, fueron probados, reemplazando otros componentes en un medio sintético.

De los extractos arriba mencionados, el extracto acuoso de papa ha sido más utilizado debido a que presenta alta frecuencia en la inducción de callo en polen y partes de plantas.

El contenido mayor de sales de papa puede variar considerablemente de acuerdo al material utilizado, esto produce efectos en el medio. El medio de papa fué mejorado por Chueng, quien creo el medio de papa II, conteniendo un 10% de extracto acuoso de papa, la mitad de los macroelementos de un medio W_4, hierro y las vitaminas de un medio MS. La frecuencia de inducción de callo en este medio fue mucho más alta que en otros medios sintéticos para el cultivo de anteras. (14).

7. Desarrollo de embriones inmaduros

Después de la antesis el grano empieza a formarse pasando a través de 3 estados, denominados estados de leche, estado blando y estado duro.

Aproximadamente nueve días después de la antesis, en el último estado de leche, el embrión es visible al ojo como un disco amarillo pálido de 1-2 mm. en diámetro dentro del endospermo. De este estado al estado de madurez el embrión puede ser extraído para iniciación de callo. En general explantes jóvenes pueden soportar más transferncias, dentro de la inducción de callo sin perder la capacidad de totipotencia en relación a los explantes viejos. (21).

8.. Cultivo de embriones de trigo

Los embriones de trigo en varios estados de desarrollo, se cultivan mayormente para tres propósitos a) Establecer cultivo de callos b) Establecer híbridos de diferentes padres incompatibles y c) para establecer haploides por eliminación de cromosomas. (2).

9. Establecimiento de cultivo de callos

Los callos derivados, especialmentede embriones jóvenes, som más adecuados para estudios de proliferación y regeneración.

Likewise, Sears y Dechard regeneraron plantas de cultivo de callos derivados de embriones formados 12 días después de la antesis. (2).

En general el cultivo de embriones en medios que contengan auxinas (usualmente 2,4-D) y citoquininas producen buen crecimiento de callo. Debido a ello, el cultivo de callos es una fuente de variabilidad, esto puede ser explotado para crear diversidad genética adicional en germoplasma de trigo y aumentar el uso de embriones híbridos para la iniciación de callos. (2).

5. MATERIALES Y METODOS

I. Area Experimental

1.1. Localización

La investigación se realizó en el Centro Experimental Docente de Agronomía -CEDA-, invernadero y laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos.

La zona de vida del CEDA, según De la Cruz (4), se encuentra en la faja termométrica subtropical húmeda, y según Holdrige, en un bosque montano bajo tropical.

Los suelos pertenecen a la serie Guatemala, para los cuales Simmons (23) reporta una textura y consistencia franco arcillosa friable, formado de cenizas volcánicas. El CEDA se encuentra en la parte sur de la Ciudad Universitaria, 14° 34' 51'' LN y 90° 33' 16'' LO y una elevación de 1476 msnm (12).

Tiene una precipitación anual de 1247 mm, con temperatura media anual de 18°C. (14).

El invernadero utilizado está cubierto de vidrio con techos de dos aguas, distribuidas de tal manera que el espacio se utiliza en forma adecuada para pasillos y bancos de propagación fijos. Cuenta además con un sistema de micro-aspersión y ventiladores laterales mecánicos.

El laboratorio de cultivo de Tejidos cuenta con un espacio de uso común, así como materiales y equipo de uso general. Se tiene alacenas para almacenar reactivos y cristalería limpia y área para manipulaciones asépticas y área de cultivos.

Para la incubación de los tejidos se empleo un cuarto de cultivo e incubadora con control de luz fluorescente de lamparas de 40 Watts, con una intensidad total de 10,000 Lux en todo el laboratorio, lo cual se midio con un fotómetro.

2. Material experimental

2.1. Variedade de trigo

En el presente estudio se utilizaron dos variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.) procedentes de semilla certificada producidas por el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola (ICTA), las cuales presenta las siguientes características:

a) Xequijel

Esta variedad se encuentra adaptada a 2150 msnm a temperaturas de 19-35°C. Alcanza alturas entre 100-110 centímetros de la base del tallo al extremo distal de la espiga.

La madurez fisiológica ocurre entre los 123-129 días. Además tiene un peso específico de 77.5 kilos por hectolitro y un rendimiento que varía de 3.5 a 4.3 toneladas por hectárea. (10).

b) Chocoyo

Es una variedad cuyas plantas se desarrollan entre los 1525-1980 msnm y a temperaturas entre 18-26°C. Alcanzan alturas entre 95-105 centímetros, la madurez fisiológica la alcanza entre 135-145 días. Su peso específico es de 76.4 kilos por hectolitro, además posee un rendimiento que oscila entre 3.5-4.3 toneladas por hectárea. (10).

3. Desarrollo de la investigación

La presente investigación se realizó en dos etapas: Etapa de campo y etapa de laboratorio.

3.1 Etapa de campo

3.1.1. Siembra de variedades

Esta actividad se realizó en el área del Centro Experimental Docente de la Facultad de Agronomía. El material utilizado lo constituyeron las variedades de trigo Xequijel y Chocoyo.

La siembra se realizó en marzo, abril y mayo del año 1990 y agosto, septiembre y octubre del mismo año. Se sembraron cuatro surcos de cinco metros de largo de cada variedad en forma escalonada, efectuando siembras con un intervalo de 15 días.

3.2 Etapa de laboratorio

3.2.1. Determinación de embriones inmaduros

Después de la emergencia de las espigas en cada una de las variedades, se observó el momento de liberación del polen, doce días después de esta liberación, se hizo la recolección de la semilla en formación, conteniendo los embriones inmaduros.

Las semillas recolectadas fueron esterilizadas en una solución de hipoclorito de sodio al 1.5% durante 10 minutos, luego se procedió a eliminar el hipoclorito de sodio mediante tres lavados consecutivos con agua destilada estéril, en la cámara de flujo laminar.

3.2.2. Extracción de embriones

Después de haberse esterilizado las semillas se procedió a la extracción de los embriones inmaduros con un bisturí, los cuales fueron sembrados en los tres diferentes medios basales evaluados y las combinaciones hormonales en frascos de vidrio de 120 ml. de capacidad, los cuales se muestran en el cuadro 6.

CUADRO 6 Combinaciones de reguladores del crecimiento utilizados con los medios basales.

2,4-D (mg/l)	ANA (mg/l)	Kinetina (mg/l)
1	0	0
1	0	0.5
0	1	0
0	1	0.5
2	0	0
2	0	0.5
0	2	0
0	2	0.5

Los frascos de vidrio de 120 ml. de capacidad con los embrions inmaduros fueron incubados en una cámara de crecimiento a temperatura constante de 28°C. en la obscuridad. Para la inducción de callo se utilizaron medios sólidos, se colocaron 15 ml. de medio por frasco.

3.2.3. Medios de cultivo

Se utilizaron como medios basales el medio de Papa II, MS y el medio N6, estos fueron esterilizados en la autoclave a 121°C. y 15 libras de presión, por espacio de 15 minutos. La composición de los mismos se muestra en el cuadro No. 7.

CUADRO 7 Formulaciones de medios de cultivo utilizado en el cultivo de embriones inmaduros de trigo.

Ingredientes	N_6 (mg/l)	MS (mg/l)	Papa II (mg/l)
Medio acuoso de papa	-	-	10%
KNO_3	2830	1900	1000
$Ca(NO_3)2.4H_2O$	-	-	100
$MgSO_4.7H_2O$	400	370	125
$(HN_4)_2SO_4$	463	-	100
KH_2PO_4	400	170	200
KCl	-	-	35
$CaCl_2.2H_2O$	166	440	-
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	27.8	27.8
$NaEDTA.H_2O$	37.3	-	37.3
$MnSO_4.4H_2O$	4.4	-	-
Na_2EDTA	-	33.6	-
$ZnSO_4$	1.5	8.6	-
H_3BO_3	1.6	6.2	-
$CuSO_4.5H_2O$	-	0.025	-
$Na_2MoO_4.2H_2O$	-	0.25	-
$CoCl_2.6H_2O$	-	0.025	-
$(NH_4)NO_3$	1650	-	-
$MnSO_4.4H_2O$	4.4	-	-
KI	0.8	0.83	1
Mioinositol	-	100	-
Acido nicotínico	0.5	0.5	-
Tiamina-HCl	1.0	1	1
Piridoxina-HCl	0.5	0.5	-
Glicina	2.0	2	-
Sucrosa	3%	30,000	3%
PH	5.8	5.7	5.8

3.2.4 Regeneración de plantas

Los callos provenientes de los medios de inducción fueron trasladados al medio de regeneración que contenía como medio basal el medio desarrollado por Murashige y Skoog. Se evaluaron el efecto de auxinas y citoquininas en la regeneración de plantas, habiendose utilizado el medio basal Murashige y Skoog sin reguladores del crecimiento y con Kinetina a una concentración de 1 mg/l y AIA a una concentración de 0.5 mg/l. El efecto de los medios de regeneración se evaluaron en forma independiente en cada una de las variedades y para cada medio de inducción.

Los callo inducidos en los medios de inducción fueron trasladados a los medios de regeneración de plantas dos semanas después de sembrados lo embriones en el medio de inducción. Las condiciones de incubación fueron bajo luz continua a 28°C.

3.2.5. Evaluación de los medios de inducción.

Para la evaluación de los medios de inducción de callo se utilizó un diseño estrictamente al azar con arreglo bifactorial, teniendo como factores los medios basales y las combinaciones hormonales con sus respectivas modalidades, con seis repeticiones y 24 tratamientos, la evaluación de la respuesta de las variedades se hizo en forma independiente.

Para la evaluación de los medios de regeneraciónde plantas se utilizó los callos provenientes de los medios de inducción, se evaluó el efecto del medio basal MS y una combinación hormonal con cinco repeticiones, para lo cual se utilizó un diseño experimental completamente al azar.

La unidad experimental estuvo constituida por un frasco de vidrio de 120 ml. de capacidad, al cual se le agregaron 15 ml. del medio de cultivo sólido y se cultivaron en el mismo diez embriones o cinco callos.

El modelo estadístico utilizado fué un diseño experimental completamente al azar en la fase de inducción de callo.

$Yijk = U + \alpha i + \gamma j + Eijk$

U = efecto de la media general

αi = efecto de la i.....esima modalidad del factor A

γj = efecto de la j.....esima modalidad del factor B

$\alpha \gamma ij$ = efecto de la interacción entre los factores A y B

Eijk = error experimental

3.2.6 Análisis Estadístico

Los valores obtenidos en la inducción de callo de las variedades Xequijel y Chocoyo, fueron sometidos a análisis de varianza (ANDEVA), aplicado al número de embriones que formaron callo. Los análisis fueron independientes para cada variedad.

Asimismo, a estas variedades se les aplicó la prueba de medias de Tukey y la prueba de estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis con la finalidad de detectar diferencias significativas entre los tratamientos debido especialmente a la presencia de datos discontínuos dentro de un mismo medio basal y combinación de reguladores del crecimiento.

3.2.7. Variables evaluadas

Para los medios de inducción de callo se determinó el número de embriones que formaron callo, se realizó a los quince días después del cultivo de los mismos.

a) Número de embriones que formaron callo.

$$\text{Porcentaje de callos} = \frac{\text{No. de embriones que formaron callo}}{\text{Total de embriones cultivados}} \times 100$$

En los medios de regeneración no se pudieron obtener las variables respuestas, pues no hubo regeneración de plantas.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

1. Inducción de callo

En la variedad de trigo Chocoyo los tratamientos consistentes en los medios basales N6, MS y Papa II suplementados con 2 mg/l de 2,4-D ó 2 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de Kinetina mostraron el mayor porcentaje en la inducción de callo, en todos ellos se obtuvo el 100% de inducción esto nos demuestra que donde hubo presencia de auxina 2,4-D se dio el mayor porcentaje de inducción de callo. Resultados intermedios se obtuvieron con los medios basales MS y Papa II suplementados con 2.0 mg/l de ANA y 0.5 mg/l de Kinetina, con dichos medios se obtuvieron porcentajes de inducción del 42% al 45%. Los resultados más bajos en la inducción de callo, fueron obtenidos con el medio basal N6, Papa II y MS suplementados con 2 mg/l de ANA, los porcentajes obtenidos están comprendidos entre 28% y 37%. El cuadro No. 8 muestra el efecto de medios de inducción de callos en la variedad de trigo Chocoyo. El efecto del medio basal MS suplementado con 2,4-D en la inducción de callo en embriones inmaduros de trigo han sido reportados anteriormente para las variedades Comalapa, Santa Ana y Zaragoza y coincide con los resultados obtenidos en cuanto al efecto de estos medios sobre la inducción de callo. (15).

El análisis de varianza para los tratamientos en la variedad Chocoyo es significante al 5%, en los tratamientos de inducción de callo y en la interacción medios-reguladores del crecimiento.

En la variedad de trigo Xequijel los tratamientos consistentes en los medios basales N6, Papa II y MS suplementados con 2 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de Kinetina mostraron el mayor porcentaje en la inducción de callo, en todos los tratamientos se obtuvo el 100% de inducción, con esto comprobamos nuevamente que donde hubo presencia de la auxina 2,4-D

se obtuvo el mayor porcentaje de inducción de callo. Resultados intermedios se obtuvieron con los medios basales Papa II y N6 suplementados con 2.0 mg/l de ANA y 0.5 mg/l de Kinetina, con estos medios los porcentajes de inducción son de 40% a 48%. Los resultados más bajos en la inducción de callo se obtuvieron con los medios basales N6 y Papa II suplementados con 2 mg/l de ANA ó 2 mg/l de ANA y 0.5 mg/l de Kinetina, con todos se obtuvo el 28% de inducción de callo.

Resultados similares han sido reportados anteriormente sobre el efecto del medio basal MS suplementado con 2,4-D en la inducción de callo en embriones inmaduros de trigo, para las variedades Comalapa, Santa Ana y Zaragoza. (15).

El análisis estadístico para los tratamientos evaluados en la variedad Xequijel mostró diferencias significativas al 5% entre tratamientos y en la interacción medios-hormonas. El cuadro No. 9 muestra el efecto de medios-hormonas en la inducción de callos en la variedad Xequijel.

Los resultados obtenidos muestran que el 2,4-D es la principal auxina que induce la formación de callo, independientemente del medio de cultivo usado. Resultados similares han sido reportados sobre el efecto de estos medios en la inducción de callo para otras variedades. (15).

CUADRO 8. Efecto de medios de cultivo y combinaciones hormonales en la inducción de callo de la variedad de trigo Chocoyo.

Medios de inducción de callo					
Medio basal	Reguladores del crecimiento				
	2,4-D	ANA (mg/l)	Kinetina	Callos formados	Producción de callo % *
MS	1.0	0.0	0.0	60	100 a
MS	1.0	0.0	0.5	60	100 a
MS	2.0	0.0	0.0	60	100 a
MS	2.0	0.0	0.5	60	100 a
N6	1.0	0.0	0.0	60	100 a
N6	1.0	0.0	0.5	60	100 a
N6	2.0	0.0	0.0	60	100 a
N6	2.0	0.0	0.5	60	100 a
Papa II	1.0	0.0	0.0	60	100 a
Papa II	1.0	0.0	0.5	60	100 a
Papa II	2.0	0.0	0.0	60	100 a
Papa II	2.0	0.0	0.5	60	100 a
Papa II	0.0	2.0	0.5	27	45 b
N6	0.0	1.0	0.5	26	43 b
MS	0.0	2.0	0.5	25	42 b c
Papa II	0.0	1.0	0.5	25	42 b c
MS	0.0	1.0	0.5	22	37 c
N6	0.0	2.0	0.5	22	37 c
MS	0.0	2.0	0.0	21	35 c d
MS	0.0	1.0	0.0	21	35 c d
N6	0.0	1.0	0.0	19	32 d
PII	0.0	2.0	0.0	19	32 d
N6	0.0	2.0	0.0	17	28 e
PII	0.0	1.0	0.0	17	28 e

* Tratamientos con la misma letra no son estadísticamente diferentes al 5% de significancia.

CUADRO 9. Efecto de medios de cultivo en la inducción de callo en la variedad de trigo Xequijel.

Medios de inducción de callo						
Medio basal	Reguladores del crecimiento					
	2,4-D	ANA (mg/l)	Kinetina	Callos formados	Producción de callo %	*
MS	1.0	0.0	0.0	60	100	a
MS	1.0	0.0	0.5	60	100	a
MS	2.0	0.0	0.0	60	100	a
MS	2.0	0.0	0.5	60	100	a
N6	1.0	0.0	0.0	60	100	a
N6	1.0	0.0	0.5	60	100	a
N6	2.0	0.0	0.0	60	100	a
N6	2.0	0.0	0.5	60	100	a
Papa II	1.0	0.0	0.0	60	100	a
Papa II	1.0	0.0	0.5	60	100	a
Papa II	2.0	0.0	0.0	60	100	a
Papa II	2.0	0.0	0.5	60	100	a
Papa II	0.0	2.0	0.5	29	48	b
N6	0.0	2.0	0.5	24	40	b
MS	0.0	1.0	0.0	17	28	c
MS	0.0	1.0	0.5	17	28	c
MS	0.0	2.0	0.0	17	28	c
MS	0.0	2.0	0.5	17	28	c
N6	0.0	1.0	0.0	17	28	c
N6	0.0	1.0	0.5	17	28	c
N6	0.0	2.0	0.0	17	28	c
Papa II	0.0	1.0	0.0	17	28	c
Papa II	0.0	1.0	0.5	17	28	c
Papa II	0.0	2.0	0.0	17	28	c

* Tratamientos con la misma letra no son estadísticamente diferentes al 5% de significancia.

2. Regeneración de plantas

En la regeneración de plantas se utilizaron callos de color amarillento con una consistencia friable y con un tamaño alrededor de 4 mm., provenientes de las variedades Chocoyo y Xequijel.

En las dos variedades de trigo Chocoyo y Xequijel no se observó respuesta en la regeneración de plantas a partir de los callos inducidos en los diferentes medios y las diferentes combinaciones hormonales usadas.

7. CONCLUSIONES

Después de haber analizado los resultados obtenidos en ésta investigación, las siguientes conclusiones son válidas para las condiciones en las cuales se llevó a cabo el experimento, utilizando los medios basales N6, Papa II y MS suplementados con las diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento utilizados en el presente estudio.

1. Los medios basales MS, Papa II y N6 suplementados con 2 mg/l de 2,4-D son los medios más indicados para inducir callo en las variedades de trigo Chocoyo y Xequijel.

2. Las variedades de trigo Chocoyo y Xequijel responden a los medios de cultivo en la inducción de callo.

3. No existe respuesta a la regeneración de plantas a partir de los callos inducidos en las variedades Chocoyo y Xequijel con el medio basal Murashige y Skoog y los reguladores del crecimiento Kinetina a una concentración de 1 mg/l y AIA a una concentración de 0.5 mg/l.

8. RECOMENDACIONES.

1. Realizar estudios similares a éste, utilizando otras variedades de trigo y los mismos medios basales de inducción de callo, suplementados con otras combinaciones hormonales, con el objeto de conocer la respuesta de estos materiales y poder utilizar la información con fines de programas de mejoramiento.

2. Efectuar estudios utilizando otros medios basales y otras combinaciones hormonales para lograr regeneración de plantas.

3. Establecer otros métodos de regeneración de plantas a partir de callos formados tomando como base los resultados obtenidos en esta investigación.

9. BIBLIOGRAFIA

1. ALVAREZ VALENZUELA, G.A. 1992. Evaluación de la respuesta a la inducción de callo y regeneración de plantas de cinco genotipos de trigo (Triticum aiestivum L.) a través del cultivo de anteras en diferentes medios de cultivo. Tésis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. p. 36-39

2. BAJAJ, Y. 1986. The response of anther culture to culture temperature in Wheat (Triticum aestivum L.). Theor-Appl. Genetic (EE.UU) 66:439-442

3. CALDERON DIAZ, J.H. 1990. Evaluación de la respuesta de cinco vairedades de trigo (Triticum aestivum L.) a la inducción de callo y regeneración de plantas en diferentes medios de cultivo a partir del cultivo de anteras. Tésis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 54 p.

4. CRUZ, S., J.R. DE LA. 1982. Clasificación de zonas de vida de Guatemala, a nivel de reconocimiento. Guatemala, Instituto Nacional Forestal. p. 38-40

5. DIAZ DEL PINO, A. 1953. Cereales de primavera. México, Salvat. p. 191-202

6. ESTADOS UNIDOS. DEPARTAMENT OF DEFENSE. 1954. Guatemala city maps. Washington, D.C. Hoja No. E954x, 01. Esc. 1:12,500,000. Color

7. GUEVARA, E. 1987. Métodos y medios de cultivo; II curso de cúltivo de téjidos. CATIE, Turrialba, Costa Rica p. 30

8. GUATEMALA. INSTITUTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGIA AGRICOLA. 1979. El cúltivo del trigo en la región I. Guatemala, ICTA. Folleto Técnico 8. 53 p.

9. --------. 1986. INSTITUTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGIA AGRICOLA. Programa nacional de trigo. Guatemala. 23 p.

10. --------. 1987. Programa Nacional de Trigo. Guatemala. 62 p.

11. --------. 1988. Informe técnico, programa nacional de trigo región I. Guatemala. 55 p.

12. --------. INSTITUTO NACIONAL DE SISMOLOGIA, VULCANOLOGIA, METEREOLOGIA e HIDROLOGIA. 1988. Atlas climatológico de la república de Guatemala. Guatemala. 21 p.

13. HE, D.G.; YANG, Y.M.; SCOTT, K.J. 1989. The effect of macro-elements in the induction of embryogenic callus from immature embryos of Wheat (Triricum aestivum L.) (Australia) 64(2):251-258.

14. HARTMAN, H.T.; HESTER D.F. 1988. Propagación de plantas, México, CESCA. p. 549-569

15. IBARRA CIFUENTES, F.R. 1994. Respuesta de siete variedades de trigo (Triricum aestivum L.) a la inducción de callo y brotes apizales, a partir de cultivo de embriones inmaduros, derivado de plantas producidas a partir de semilla irradiada con seis dosis de rayos gamma (cesio 137). Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 30 p.

16. KHAN, S.H. 1975. Technique for staining rice-chomosomes, cytologia. Estados Unidos, University of Idaho, Departament of plant, soil and Entomological Sciences. 16 p.

17. LHOTOVÁ, M.; KUCERA, L. 1990. Embryogenic callus induction and plant regeneration from cultured immature embryos of Wheat. Genetika a Slechteni (Checoeslovaquia) 26(4):257-264.
Tomado de: Review Wheat, Barley and Triticale Abstracts (Méx.) 9(1):165. 1992

18. LIU, H.J. et al. 1992. Effects of casein hydrolysate on the response in immature embryo culture of Wheat (Triticum aestivum L.). Japanese Journal of Breeding (Japón) 42(2): 367-373.
Tomado de: Review Wheat, Barley and Triticale Abstracts. (Méx.) 10(2):145. 1993

19. MIYARES, S.R. 1986. Paquetes de programas en lenguaje basic para pruebas estadísticas no paramétricas usuales. Tésis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos, Facultad de Agronomía. p. 19-20, 109, 138-139

20. REYES C.P. 1982. Diseño de experimentos aplicados. México, D.F., Trillas. p. 299-302

21. SCHILDE, L.; SCHIMIEDICHE, p. 1984. El cultivo de téjidos, su pasado, presente y futuro. Lima, Perú, Centro Internacional de la Papa. Circular No. 11. 7 p.

22. SHARP, R.S. et al. 1984. Handbook of plant cell culture. New York, Macmillan. v.2, p. 108-131

23. SIMMONS, C.S.; TARANO, J.M.; PINTO, J.H. 1959. Clasificación de reconocimiento de los suelos de la república de Guatemala. Trad. por Pedro Tirado Sulzona. Guatemala, Ed. José de Pineda Ibarra. 1000 p.

24. TREVIÑO, R.J. 1986. Estudio del cultivo in vitro de embriones inmaduros de Coffea arabica L. Tésis Mag. Sc. Turrialba, C.R., Programa Universidad de Costa Rica. p. 170-178

25. WHITE, P.R. 1934. Potentiaylly unlimited of excised tomato root in a liquid medium. Plant Physiology (EE.UU) 8(4): 560-585

Vo. Bo. Miriam de la Roca

10. APENDICE

Apendice 1. Análisis de varianza del efecto de medios de cultivo en la inducción de callo en la variedad de trigo Xequijel.

F.V.	G. DE L.	S. C.	C. M.	F.C.	F.T.5%
Tratamientos	23	113.57	4.93	94.80*	1.62
Medios	2	2.08	1.04	20.00*	3.07
Hormonas	7	106.95	15.27	293.65*	2.09
Medios-hormonas	14	4.54	0.32	6.15*	1.77
ERROR	120	6.88	0.052		
TOTAL	143	120.45			

F.V. = Fuentes de variación

G.L. = Grados de libertad

S.C. = Suma de cuadrados

C.M. = Cuadrados medios

* = significancia al 0.05%

Coeficiente de Variación = 9.50%

Apendice 2. Prueba de tukey para la inducción de callo de la variedad de trigo Xequijel. (GLE. = 120, = 0.05)

MEDIOS	COMBINACIONES HORMONALES			MEDIAS	
	2,4-D	ANA (mg/l)	Kinetina		
MS	1.0	0.0	0.0	3.31	
MS	1.0	0.0	0.5	3.31	
MS	2.0	0.0	0.0	3.31	
MS	2.0	0.0	0.5	3.31	
N6	1.0	0.0	0.0	3.31	
N6	1.0	0.0	0.5	3.31	a
N6	2.0	0.0	0.0	3.31	
N6	2.0	0.0	0.5	3.31	
Papa II	1.0	0.0	0.0	3.31	
Papa II	1.0	0.0	0.5	3.31	
Papa II	2.0	0.0	0.0	3.31	
Papa II	2.0	0.0	0.5	3.31	b
MS	0.0	2.0	0.0	2.29	c
MS	0.0	1.0	0.0	1.94	
Papa II	0.0	2.0	0.5	1.61	
MS	0.0	1.0	0.5	1.61	d
N6	0.0	2.0	0.5	1.54	
Papa II	0.0	1.0	0.0	1.51	
N6	0.0	2.0	0.0	1.43	
Papa II	0.0	1.0	0.5	1.39	e
MS	0.0	2.0	0.5	1.33	
Papa II	0.0	2.0	0.0	1.32	
N6	0.0	1.0	0.0	1.30	
N6	0.0	1.0	0.5	1.20	

COMPARADOR WP = 0.47

Las medias con la misma letra son estadísticamente iguales al 5 % de significancia.

Apendice 3. Análisis de varianza del efecto de medios de cultivo en la inducción de callo en la variedad de trigo Chocoyo.

F.V.	G. DE L.	S.C.	C.M.	F.C.	F.T.5%
Tratamientos	23	113.57	4.93	86.49*	1.62
Medios	2	2.08	1.04	18.24*	3.07
Hormonas	7	106.95	15.27	267.89*	2.09
Medio-Hormonas	14	4.54	0.32	5.61*	1.77
ERROR	120	6,88	0.057		
TOTAL	143	120.45			

F.V. = Fuentes de variación

G.L. = Grados de libertad

S.C. = Suma de cuadrados

C.M. = Cuadrados medios

* = Significancia al 0.05%

Coeficiente de Variación = 10.15%

Apendice 4. Prueba de Tukey para la inducción de callo de ls variedad de trigo Chocoyo. (GLE. = 120 0.05)

MEDIOS	COMBINACIONES HORMONALES			MEDIAS	
	2,4-D	ANA (mg/l)	Kinetina		
MS	1.0	0.0	0.0	3.31	
MS	1.0	0.0	0.5	3.31	
N6	1.0	0.0	0.0	3.31	
N6	2.0	0.0	0.0	3.31	
N6	2.0	0.0	0.5	3.31	
MS	2.0	0.0	0.0	3.31	a
MS	2.0	0.0	0.5	3.31	
Papa II	1.0	0.0	0.0	3.31	
Papa II	1.0	0.0	0.5	3.31	
Papa II	2.0	0.0	0.0	3.31	
Papa II	2.0	0.0	0.5	3.31	
N6	1.0	0.0	0.5	2.59	b
Papa II	0.0	2.0	0.5	1.61	
MS	0.0	2.0	0.5	1.57	
MS	0.0	1.0	0.0	1.54	
Papa II	0.0	1.0	0.0	1.51	
N6	0.0	2.0	0.5	1.46	c
MS	0.0	1.0	0.5	1.44	
N6	0.0	2.0	0.0	1.43	
MS	0.0	2.0	0.0	1.42	
Papa II	0.0	1.0	0.5	1.39	
N6	0.0	1.0	0.5	1.36	
N6	0.0	1.0	0.0	1.35	
Papa II	0.0	2.0	0.0	1.31	

COMPARADOR WP = 0.50

Las medias con la misma letra son estadísticamente iguales al 5% de significancia.

Apendice 5. Analisis de varianza de Keuskal-Wallis. Variedad Chocoyo.

J	Tratamientos	nj	Rj	Rj^2/nj
1	n1	6	669.0	74593.5
2	n2	6	452.5	34126.04
3	n3	6	183.5	5612.04
4	n4	6	196.5	6435.57
5	n5	6	669.0	74593.5
6	n6	6	669.0	74593.5
7	n7	6	220.0	8066.66
8	n8	6	217.0	7848.16
9	p1	6	669.0	74593.5
10	p2	6	669.0	74593.5
11	p3	6	255.5	10330.04
12	p4	6	218.5	7957.04
13	p5	6	669.0	74593.5
14	p6	6	669.0	74593.5
15	p7	6	207.0	7141.5
16	p8	6	246.0	10086.0
17	m1	6	669.0	74593.5
18	m2	6	669.0	74593.5
19	m3	6	193.2	6221.04
20	m4	6	193.5	6240.37
21	m5	6	669.0	74593.5
22	m6	6	669.0	74593.5
23	m7	6	170.0	4816.16
24	m8	6	269.0	12973.5
		144		948,896.5

Grados de libertad = 23

Valor de H = 123 > 35.2 (Ji cuadrado tabulado) 5%

Conclusión: Si hay diferencia significativa entre los tratamientos.

Apendice 6. Análisis de varianza de Kruskal-Wallis. Variedad Xequijel

J	Tratamientos	nj	Rj	Rj^2/nj
1	m1	6	669.0	74593.5
2	m2	6	669.0	74593.5
3	m3	6	406.5	27540.37
4	m4	6	225.5	8475.04
5	m5	6	669.0	74593.5
6	m6	6	669.0	74593.5
7	m7	6	346.5	20010.35
8	m8	6	165.95	4859.9
9	p1	6	669.0	74593.5
10	p2	6	669.0	74593.5
11	p3	6	215.8	7761.60
12	p4	6	175.8	5150.94
13	p5	6	669.0	74593.5
14	p6	6	669.0	74593.5
15	p7	6	155.35	4022.27
16	p8	6	246.35	10155.82
17	n1	6	669.0	74593.5
18	n2	6	390.0	25350.0
19	n3	6	146.4	3572.16
20	n4	6	115.35	2217.60
21	n5	6	669.0	74593.5
22	n6	6	669.0	74593.5
23	n7	6	194.5	6305.04
24	n8	6	126.4	8542.82
		144		954221.41

Grados de libertad = 23

Valor de H = 96.30 > 35.2 (Ji cuadrado tabulado)5%.

<u>Conclusión:</u> Si hay diferencia significativa entre los tratamientos.

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

Ref. Sem.052-94

LA TESIS TITULADA: "EVALUACION DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA INDUCCION DE CALLO Y REGENERACION DE PLANTAS EN EMBRIONES INMADUROS DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) EN LAS VARIEDADES CHOCOYO Y XEQUIJEL".

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: SERGIO ANTONIO RAMOS SIERRA

CARNET No: 78-03735

HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Víctor Alvarez Cajas
Ing. Agr. Waldemar Nufio
Ing. Agr. Francisco Vásquez
Ing. Agr. Fernando Rodríguez

Los Asesores y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha cumplido con las normar universitarias y reglamentos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Ing. Agr. Edgar Franco
A S E S O R

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

Ing. Agr. Rolando Lara Alecio
DIRECTOR DEL IIA.

FACULTAD DE AGRONOMIA
DIRECCION
Instituto de Investigaciones Agronómicas

I M P R I M A S E

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

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA
DECANO

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

c.c. Control Académico
Archivo
/prr.