

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

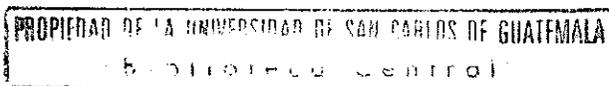
**“RESPUESTA DE DOS DIFERENTES TIPOS DE EXPLANTE DE ZAPOTE (
Pouteria sapota L. Cronquist.) A DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO IN
VITRO”**

**TESIS
PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD
DE AGRONOMIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMA.**

**POR
CARLOS ESTUARDO ROCA CANET**

**En el acto de investidura como
INGENIERO AGRONOMO EN SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA.
EN EL GRADO ACADEMICO DE LICENCIADO.**

Guatemala, octubre de 1996.



01
T(1647)
2.3

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.

RECTOR

Dr. JAFETH ERNESTO CABRERA FRANCO

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA.

DECANO	ING. AGR.	JOSE ROLANDO LARA ALECIO
VOCAL 1o.	ING. AGR.	JUAN JOSE CASTILLO MONT.
VOCAL 2o.	ING. AGR.	WILLIAM ROBERTO ESCOBAR LOPEZ.
VOCAL 3o.	ING. AGR.	CARLOS ROBERTO MOTTA.
VOCAL 4o.	P. A.	HENRY ESTUARDO ESPAÑA MORALES.
VOCAL 5o.	Br.	MYNOR JOAQUIN BARRIOS OCHAETA.
SECRETARIO	ING. AGR.	GUILLERMO EDILBERTO MENDEZ BETETA.

Guatemala, Octubre de 1996

Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala.

Señores representantes:

De conformidad con las normas establecidas en la ley orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala , tengo el honor de someter a su consideración el trabajo de tesis titulado:

RESPUESTA DE DOS DIFERENTES TIPOS DE EXPLANTE DE ZAPOTE (*Pouteria sapota* L. Cronquist.) A DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO IN VITRO”

Presentándolo como requisito previo para optar al título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

Esperando merezca su aprobación, me suscribo de ustedes,

Atentamente:



Carlos Estuardo Roca Canet.

ACTO QUE DEDICO

A:

SUPREMO CREADOR

MIS PADRES

Edgar Manfredo Roca
Menéndez y Myriam Canet
Samayoa de Roca. Por su
amor y enseñanza.

MIS HERMANOS

Edgar Manfredo, Brenda Marleni,
Laura Marina, Maria Lorena, Iliana
Marisol y Jose Antonio. Con mucho
cariño.

MEMORIA DE MI HERMANA

Myriam Elena.

MEMORIA DE MIS ABUELOS

Jose Antonio Roca Aguirre, Laura
Estela Menéndez, Jose Antonio Canet
Gordillo y Flora Marina Samayoa
Flores. Por el amor y los momentos
que vivimos y que los mantienen
vivos en mis pensamientos.

MIS SOBRINOS

Alejandro y Manfredo.

FAMILIA EN GENERAL

Con todo el cariño.

MIS AMIGOS

Por las experiencias inolvidables que
la buena amistad genera y que hace
que en el transcurrir del tiempo
perduren. Con cariño y respeto.

TESIS QUE DEDICO

A:

-Dios.

- Mis Padres

-Mi Patria Guatemala.

-Universidad de San Carlos de Guatemala.

AGRADECIMIENTOS

A:

MIS ASESORES DE TESIS: ING. AGR. EDGAR OSWALDO FRANCO E ING. AGR. ANA DOLORES AREVALO. por su colaboración y asesoría en el desarrollo de este estudio.

Ingenieros Domingo Amador y Juan Carlos Granados por su colaboración en el desarrollo del presente trabajo.

Señor Reginaldo Soma, por su colaboración brindada durante la fase de laboratorio del estudio.

Miembros y personal administrativo de la finca Santa María Buena Vista por el apoyo brindado para la realización del trabajo.

INDICE GENERAL

INDICE DE CUADROS	ix
INDICE DE FIGURAS	xi
INDICE DE ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiii
1. Introducción	1
2. Definición del Problema	2
3. Marco teórico.	3
3.1. Marco Conceptual	3
3.1.1. Origen y distribución	3
3.1.2. Morfología.	4
3.1.3. Clasificación Botánica	5
3.1.4. Fenología	5
3.1.5. Usos.	5
3.1.6. Propagación	6
3.1.7. Aplicación e importancia de la Biotecnología en el desarrollo agrícola	7
3.1.8. Cultivo de Tejidos	8
3.1.8.1. Definición	8
3.1.8.2. Breve historia.	9
3.1.8.3. Ventajas y Desventajas.	9
3.1.8.4. El cultivo de tejidos en la propagación clonal	10
3.1.8.5. El cultivo de tejidos en la conservación y desarrollo de recursos fitogenéticos	11
3.1.9. Problemas que limitan el desarrollo de cultivo de tejidos en plantas con crecimiento secundario	12
3.1.9.1. Factores Económicos.	12
3.1.9.2. Factores Técnicos	13
3.1.10. Técnicas de micropropagación para la formación de clones en plantas con crecimiento secundario	16
3.1.10.1. Elongación de Meristemos, Puntas y Yemas Axilares	16
3.1.10.2. Organogénesis Directa.	17
3.1.10.3. Embriogénesis somática.	18
3.1.11. Fases del Cultivo de Tejidos.	19
3.1.11.1. Establecimiento.	19
3.1.11.2. Multiplicación.	20
3.1.11.3. Acondicionamiento.	20
3.1.11.4. Trasplante.	21
3.1.12. Medios de Cultivo	21
3.1.12.1. Sales inorgánicas.	21
3.1.12.2. Compuestos orgánicos	21
3.1.12.4. Sostenes inertes.	26
3.2 Marco Referencial.	

3.2.1.	Propagación in-vitro en plantas con crecimiento secundario.	26
3.2.2.	Fases para el desarrollo inicial de un protocolo	38
3.2.3.	Procedencia y tipo de material	29
3.2.4.	Area experimental	29
4.	Objetivos	30
5.	Metodología	31
5.1.	Selección de explantes	31
5.2.	Colección del material	32
5.3.	Selección de los medios basales	32
5.4.	Elaboración de medios	33
5.5.	Procedimiento y época de siembra	33
5.5.1.	Subcultivos	34
5.5.2.	Condiciones de Cultivo	34
5.6.	Desinfección	34
5.7.	Tratamientos	35
5.8.	Toma de datos	43
5.9.	Análisis de la información	43
6.	Resultados y discusión	44
6.1.	Meristemos	44
6.1.1.	Respuesta de los meristemos a dos diferentes medios de cultivo con dos diferentes tipos de reguladores del crecimiento (BAP y GA3) en diferentes concentraciones.	44
6.1.2.	Respuesta de los meristemos y las puntas meristemáticas a un medio liquido de inducción MS con dos diferentes concentraciones de GA3 y un medio de desarrollo con ANA, BAP y GA3 en similar concentración.	46
6.1.3.	Respuesta de las puntas meristemáticas a dos medios basales de iniciación con cuatro niveles de GA3 y dos medios basales de desarrollo con tres tipos de reguladores del crecimiento en diferentes concentraciones.	51
6.2.	Hojas	
6.2.1.	Respuesta de los explantes de hoja a la aplicación de ANA y BAP en diferentes concentraciones.	66
6.2.2.	Respuesta de explantes de hoja a medios liquidos de inducción con diferentes concentraciones de ANA y BAP.	66
6.2.3.	Estudio de la respuesta de explantes de hoja a la suplementación de ANA y BAP en diferentes concentraciones.	68
7.	Conclusiones	70
8.	Recomendaciones	73
9.	Bibliografía	
10.	Apéndice	75

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Especies del género <u>Pouteria</u> distribuidas en Guatemala.	3
Cuadro 2: Tratamientos utilizados para el estudio de la respuesta de los meristemos en dos diferentes tipos de medios basales con dos diferentes clases de reguladores del crecimiento en diferentes concentraciones.	36
Cuadro 3: Tratamientos utilizados para el estudio de la respuesta de los meristemos y las puntas meristemáticas a medios líquidos de inducción.	37
Cuadro 4: Medios basales de iniciación con 4 niveles de GA3 utilizados sobre las puntas meristemáticas.	38
Cuadro 5: Medios basales de desarrollo con tres diferentes tipos de hormonas en diferentes concentraciones.	38
Cuadro 6: Tratamientos hormonales utilizados para el estudio de la respuesta de los explantes de hoja a la aplicación de ANA y BAP en diferentes concentraciones.	40
Cuadro 7: Tratamientos utilizados para evaluar la respuesta de las hojas a medios líquidos de inducción con diferentes concentraciones de ANA y BAP.	41
Cuadro 8: Tratamientos evaluados durante el tercer estudio para la respuesta de explantes de hoja a distintas concentraciones de ANA y BAP.	42
Cuadro 9: Estudio de la respuesta de los meristemos a dos medios basales MS y WPM con dos tipos de reguladores del crecimiento en diferentes concentraciones.	45
Cuadro 10: Estudio de la respuesta de los meristemos y las puntas meristemáticas a medios líquidos de inducción MS, con dos concentraciones de GA3	47
Cuadro 11: Respuesta de los meristemos y las puntas meristemáticas a medios de desarrollo MS suplementados con ANA, BAP y GA3 en similar concentración.	48
Cuadro 12: Estudio de la respuesta de las puntas meristemáticas a dos medios basales de iniciación con cuatro niveles de GA3 y dos medios basales de desarrollo suplementados con tres tipos de reguladores del crecimiento en diferentes concentraciones.	52

Cuadro 13: Tamaño y condición de los brotes producidos por puntas meristemáticas de zapote utilizando dos medios basales de cultivo con tres diferentes tipos de reguladores del crecimiento	58
Cuadro 14: Tamaño y condición de los callos producidos por puntas meristemáticas de zapote utilizando dos diferentes medios basales de cultivo con tres diferentes tipos de reguladores del crecimiento en diferentes concentraciones.	64
Cuadro 15: Estudio de la respuesta de explantes de hoja a diferentes concentraciones de ANA y BAP.	67
Cuadro 16: Estudio de la respuesta de explantes de hoja a medios líquidos de inducción con diferentes concentraciones de ANA y BAP.	68
Cuadro 17: Estudio de la respuesta de explantes de hoja a la suplementación de ANA y BAP en diferentes concentraciones.	69
Cuadro 18: Soluciones concentradas utilizadas en la preparación de los medios MS y WPM	76
Cuadro 19: Resultados de desinfección de Hojas	77
Cuadro 20: Resultados de desinfección de explantes de hoja en base al tratamiento	80
Cuadro 21: Resultados de desinfección de hoja en base al tamaño de la misma	81
Cuadro 22: Respuesta de los meristemas a distintos tratamientos de desinfección	82
Cuadro 23: Cuadro resumen del estudio "Respuesta de diferentes tipos de explante de Zapote (<i>Pouteria sapota</i>) a diferentes medios de cultivo <i>in vitro</i> "	84

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Respuesta de las puntas meristemáticas y los meristemos a medios líquidos de inducción con diferentes niveles de GA3	48
Figura 2: Respuesta de los meristemos y las puntas meristemáticas en medios de desarrollo con iguales concentraciones de ANA, BAP y GA3	50
Figura 3: Respuesta de las puntas meristemáticas a diferentes medios basales	54
Figura 4: Respuesta de las puntas meristemáticas a medios de inducción suplementados con cuatro niveles de GA3	55
Figura 5: Respuesta de las puntas meristemáticas a la elongación y desarrollo en medios de desarrollo suplementados con ANA, BAP y GA3 en diferentes concentraciones	56
Figura 6: Respuesta de los tratamientos a la formación de brotes en porcentaje.	59
Figura 7: Tamaño promedio de los brotes producidos en base al tratamiento	61
Figura 8: Respuesta de los tratamientos a la formación de callo en base a porcentaje	64
Figura 9: Tamaño promedio de los callos producidos por los distintos tratamientos	65

INDICE DE ABREVIATURAS

AC.	Acido cítrico
AIA.	Acido Indolácetico
AIB.	Acido Indolbutírico
ANA.	Acido Naftalenacético
BA.	Bencil Adenina
BAP.	Bencil Amino Purina
CA.	Carbón Activado
CH.	Caseína Hidrolizada
GA3.	Acido giberélico
KIN.	Kinetina
MS.	Medio basal de Murashigue y Skoog.
WPM.	Medio basal Woody Plant Medium
2,4 D.	Acido 2,4 Diclorofenoxiacético

**“RESPUESTA DE DOS DIFERENTES TIPOS DE
EXPLANTE DE ZAPOTE (*Pouteria sapota* L. Cronquist)
A DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO *IN VITRO*”**

**“RESPONSE OF TWO DIFFERENT TYPES OF EXPLANTS OF MAMEY
(*Pouteria sapota* L. Cronquist) TO DIFFERENT CULTURE MEDIUMS *IN
VITRO*”**

RESUMEN

El cultivo del Zapote (*Pouteria sapota* L. Cronquist) pese a una creciente demanda del fruto en el mercado, a la amplia gama de subproductos que se obtienen como resultado de su explotación y a los beneficios que brinda para el desarrollo y conservación de los agroecosistemas donde se desarrolla, afronta entre otros dos problemas fundamentales que limitan su desarrollo y establecimiento en plantaciones comerciales, los cuales son: a) la falta de métodos eficaces y eficientes de propagación que permitan la obtención de gran cantidad de plantas con características homogéneas y b) La conservación y desarrollo de clones a partir de individuos silvestres promisorios para el desarrollo de programas de mejoramiento genético. Por ello se propuso conocer la respuesta que dicha planta tiene cultivo *in vitro*, utilizando como técnicas la elongación y desarrollo de los meristemos terminales, y la organogénesis directa en hojas en crecimiento: dada las ventajas que estas presentan, para la formación y conservación de clones con un escaso nivel de variabilidad.

Los explantes fueron seleccionados en base a la disponibilidad de los mismos, su fácil maniobrabilidad y al tipo de respuesta que se pretendía.

Seguidamente se procedió a determinar un tratamiento de desinfección adecuado del explante, para finalmente evaluar la respuesta del explante en los medios basales Murashigue y Skoog (MS) y Woody Plant Medium (WPM), suplementados con tres diferentes tipos de hormonas (Auxinas, Citocininas y Giberelinas), en diferentes concentraciones.

En los meristemos el primer estudio consistió en determinar la respuesta de los meristemos terminales a dos diferentes medios basales con diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (GA3); en el segundo estudio se evaluó la respuesta de las puntas meristemáticas y los meristemos a medios líquidos de inducción MS y finalmente, en el tercer estudio se determinó la respuesta de las puntas meristemáticas a dos medios basales de iniciación con cuatro niveles de ácido giberélico (GA3) y dos medios basales de desarrollo suplementados con ácido naftalenacético (ANA), bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (GA3) en diferentes concentraciones.

Para el caso de las hojas durante el primer estudio se determinó la respuesta a diferentes concentraciones de ANA y BAP, en el segundo se estudió la respuesta a medios de inducción con diferentes concentraciones de ANA y BAP y medios de desarrollo sin hormonas, para finalmente en el tercer estudio determinar la respuesta de explantes de hoja a la suplementación de ANA y BAP en diferentes concentraciones, reduciendo la concentración de los desinfectantes, aumentando la concentración de ácido cítrico y aumentando el número de lavados.

Dada la característica explorativa del trabajo los resultados fueron analizados en base a valores absolutos, medias y porcentajes de las variables respuesta.

Las puntas meristemáticas son desinfectadas adecuadamente cuando se les aplica hipoclorito de sodio comercial al 1.06% durante 15 minutos, sumergiéndolo los explantes en una solución de ácido cítrico de 150 mg/l.

Las puntas meristemáticas se elongan y desarrollan, al tratarlas en un medio líquido de inducción MS, suplementado con GA3 en concentraciones que van desde 0.5 hasta 1 mg/l y carbón activado a 1000 mg/l durante 8 días en un agitador horizontal a 100 r.p.m. En el traslado a medios sólidos de desarrollo suplementados con diferentes concentraciones de BAP (1 a 2 mg/l), ANA (0.5 mg/l) y GA3 (0.5 mg/l) los explantes mostraron diferentes tipos de respuesta atendiendo a la concentración hormonal.

La desinfección de hojas es adecuada cuando se aplica alcohol al 70% un minuto e hipoclorito de sodio al 1.06% 10 minutos.

El Estudio fue llevado a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la subarea de Manejo y Mejoramiento de Plantas de la FAUSAC: durante los meses de Septiembre de 1995 a Junio de 1996.



1. INTRODUCCION.

El intercambio, conservación y desarrollo de los recursos fitogenéticos es cada vez mayor, y el empleo de la Biotecnología como herramienta tendiente a mejorar la eficacia y eficiencia de los sistemas productivos en general, constituye cada día más una necesidad irremplazable, a medida que la diversificación agrícola aumenta como resultado de mercados cada vez más exigentes en cuanto a variedad, calidad, y cantidad de productos. (9)

Guatemala por su ubicación geográfica y su diversidad de zonas ecológicas constituye un centro de origen de Recursos Fitogenéticos importante tanto de especies desarrolladas como el Maíz hasta de cultivos que por razones económicas, biológicas, agrícolas y culturales permanecen como marginados, aunque posean buenas perspectivas generales de mercado. Dentro de este contexto podemos enmarcar a el Zapote (*Pouteria sapota* L. Cronquist) que constituyó el objeto de estudio del presente trabajo y que afronta entre otros, dos problemas fundamentales que limitan el desarrollo de esta especie en explotaciones comerciales, los cuales son: a) La falta de métodos eficaces y eficientes que permitan la propagación clonal de individuos con buenas características productivas y b) La conservación y desarrollo de genotipos silvestres de buenas características productivas para el desarrollo de programas de mejoramiento genético. (9)

Por ello se propuso estudiar la respuesta que dicha planta tiene al cultivo *in vitro*, utilizando dos tipos de explantes (meristemos apicales y hojas), dos medios basales de cultivo (MS y WPM) y tres tipos de reguladores del crecimiento (ANA, BAP y GA3) como una posible solución tendiente a mejorar no sólo el proceso de establecimiento de una manera más rápida y eficiente; sino también, promoviendo un aumento significativo en la producción al poder propagar de forma masal individuos con buenas características productivas.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como resultados de mercados cada vez más exigentes en cuanto a cantidad y calidad de productos se generan oportunidades para el desarrollo de cultivos que permanecen marginados como consecuencia de factores biológicos, agrícolas, económicos y culturales.

El cultivo del zapote (*Pouteria sapota* L. Cronquist.), pese a una creciente demanda del fruto en el mercado¹ a la amplia gama de subproductos que se obtienen como resultado de su explotación² y a los beneficios que brinda para el desarrollo y conservación de los agroecosistemas donde se encuentra establecido, afronta entre otros, dos problemas fundamentales que limitan el desarrollo y establecimiento de plantaciones comerciales, los cuales son: a) La falta de métodos eficaces y eficientes que permitan la obtención de gran cantidad de plantas con características productivas homogéneas deseables y b) La falta de formación y conservación de clones a partir de individuos silvestres con características altamente productivas que permitan el desarrollo de programas de mejoramiento genético, por lo que en el presente trabajo propuso estudiar la respuesta de esta planta a métodos de propagación *in vitro* como una medida tendiente a desarrollar tecnología para mejorar el proceso de establecimiento en plantaciones comerciales de una manera más eficiente y promover el desarrollo y conservación de la variabilidad genética que se tiene de esta especie en el país, para la formación de clones con buenas características productivas.

¹La demanda del fruto en el mercado internacional aumenta a razón del 150% anual (23)

² Como resultado de la explotación del fruto se obtienen también subproductos como: aceites de carácter cosmético, madera, e insecticidas botánicos (23)



3. MARCO TEÓRICO.

3.1. MARCO CONCEPTUAL.

3.1.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN.

De acuerdo a Morena (1), el zapote (*Pouteria zapota* L.) es originario de las tierras bajas de América Central en la región biogeográfica conocida como Mesoamérica. Se desarrolla en alturas que van de 0 a 1000 metros sobre el nivel del mar, con precipitaciones anuales entre 800 a 1200 mm, creciendo en la mayoría de los casos en plantaciones naturales con buena diversidad de especies o en huertos familiares como una fuente alternativa de ingresos y alimentación.

Azúrdia (2), afirma que el género *Pouteria* está ampliamente distribuido en las tierras bajas de Guatemala, ocupadas por las zonas ecológicas conocidas como Bosque Húmedo y Bosque Muy Húmedo Subtropical Cálido con alrededor de 9 especies, con excepción de la especie *P. amygd.* L. Cronquist que se distribuye en el altiplano central en alturas mayores de 800 metros sobre el nivel del mar, en la zona ecológica conocida como Bosque Húmedo Sub Tropical Templado. (Ver Cuadro 1)

CUADRO 1: Especies del género *Pouteria* distribuidas en Guatemala. (23)

1. *Pouteria amygdalina* (Standl) Bahem.
2. *Pouteria zapotecoana* (HBK) Bahem.
3. *Pouteria durkenii* (Standl) Bahem.
4. *Pouteria galfrancorum* Cronquist, Lloyd & Dudley.
5. *Pouteria nigropurpurea* (Standl) Bahem.
6. *Pouteria zebellana* (Standl) Wiers.
7. *Pouteria leylandii* Cronquist & Lloyd.
8. *Pouteria sapota* L. Cronquist.
9. *Pouteria campbellii* (Don Sm) Bahem.
10. *Pouteria amygd.* L. Cronquist.

Como resultado de la conquista y la colonización, el Zapote fue distribuido por los españoles al Caribe, América del Sur, El Caribe y Hawái, cultivándose también con éxito en el sur de Florida donde 4 variedades son producidas comercialmente (19)(23).

3.1.2. MORFOLOGIA:

Según Jorge (1 con 14): El Zapote (*Casearia sepiaria*) es un árbol de forma polimorfa de aproximadamente 30 m de altura de copa simétrica o irregular (14). El árbol crece y se renueva continuamente, las hojas son simples y de filotaxia alterna que se centran en el ápice de las ramillas en grupos compactos. La forma de las mismas varía de ovada a lanceolada con el ápice obtuso o redondo a veces apiculado, miden entre 10 x 5 cm de largo por 4 cm de ancho por lo común glabras. En la parte del haz son verdes oscuras y brillantes, en el envés son más claras con prominentes nervios laterales, la nervadura es reticulada y paralela. (14)

Las flores brotan en numerosos grupos que van de 2 a 6 flores en ramillas terminales inmediatamente debajo del follaje nuevo. Tienen entre 8 y 10 sépalos a menudo más anchos que altos. La corola es de 9 a 17 cm de largo de forma tubular amarillenta que se abre en la parte superior en 5 segmentos o pétalos. Existen 5 estambres delgados en posición alterna con los pétalos. El pistilo mide alrededor de 10 mm, cuyo ovario es subsescente y normalmente con 5 celdas. (14)

El fruto es una baya de forma variable con entre 10 y 20 semillas de tamaño. Pueden ser elongados fusiformes y asimétricos de entre 2.5 cm de largo por 1.5 cm de ancho. El pericarpio es de consistencia leñosa y quebradiza. El mesocarpo varía considerablemente de textura y color (rojo amarillado y grisáceo), aumentando azúcar y sustancias aromáticas. El endocarpo es más blando y fibroso de consistencia más fuerte. (14)

3.1.3. CLASIFICACION BOTANICA:

Reino Plantae

Subreino Embryobionthae

División Magnoliophyta

Clase Magnoliopsida

Subclase Dicotyledonae

Orden: Ebenales

Familia Sapotaceae

Género Pouteria

Especie P. sapota

3.1.4. FENOLOGIA:

Poco se ha estudiado acerca de la fenología del cultivo del Zapote, se sabe que el tipo de polinización es mixta (autogámica-alógámica) siendo predominantemente álogama. La floración se lleva acabo durante los meses de abril a junio, variando de acuerdo a la ubicación geográfica, a las condiciones climáticas y al tipo o variedad. La fructificación se lleva acabo durante los meses de mayo a noviembre presentándose simultáneamente sobre la misma rama o en ramas diferentes con la floración. (23)

En algunas regiones durante los meses de enero a marzo las plantas se defolian totalmente lo que puede estar asociado a un tipo de respuesta por falta de agua. (consulta personal Ing. Agr. Edgar Franco)

La producción de fruto ocurre entre los 10 y 15 años de edad variando de acuerdo a la variedad y el clima, en injertos el periodo se reduce de 6 a 8 años.

3.1.5. USOS:

El principal producto que se obtiene como resultado del cultivo del zapote es el fruto cuya pulpa es generalmente industrializada para la comercialización de productos como galeas, conservas, helados y jugos. Según Moreira (14), el fruto posee un alto valor nutritivo y palatabilidad, conteniendo al rededor de

30% de carbohidratos digeribles sobre su peso fresco, además de proteínas, fibra, calcio, fósforo, niacina y ácido ascórbico. (23)

El aceite obtenido de las semillas es utilizado como saborizante para el chocolate, como tónico capilar para el fortalecimiento del cabello y retener la caída del mismo. (23)

De la cocción de las hojas y la corteza, se obtienen productos para combatir la arteriosclerosis y reducir la presión arterial. La madera es de un color rojizo y sólida, utilizada en la construcción de muebles y carretas. (23)

3.1.6. PROPAGACION:

La propagación se lleva a cabo por semillas con alrededor de un 90% de germinación (Consulta personal a Ing. Agr. Edgar Martínez.). En plantaciones comerciales las plantas son injertadas por un procedimiento conocido como cuatro enchapes, el cual se realiza sobre plantas jóvenes que poseen alrededor de 60 cm. de alto de y de 2 1/2 a 3 años dependiendo del cultivar y de las condiciones ambientales.

El patrón es cortado por la parte media a aproximadamente 30 cm. con un diámetro que varía entre 75 y 125 mm. sobre el cual se realizan 4 cortes a lo largo de la corteza de aproximadamente 7 cm. de largo cortando la parte de madera que quedó en el medio. Posteriormente, se corta la púa que consiste en la parte terminal de una rama lateral de aproximadamente 15 cm. de largo, la cual es defoliada y cortada en la parte inferior hacia abajo a lo largo de la corteza a manera de formar el cuadro removido del patrón la cual se enchapa con el mismo con plástico de polietileno por alrededor de 15 días. (5)

El porcentaje de pegue en injerto es bajo (entre un 40 a 50%) siendo en Florida donde se ha logrado injertar con mayores éxitos (67%).(5). Lazo Rodríguez citado por Campbell y Lara (5) realizó con éxito algunos injertos con púa lateral en Zapote, enfatizando en su trabajo la necesidad de drenar el látex de los tallos de la vareta y el patrón previo a la injertación. Guadalupe Salcedo y otros (5) evaluaron el porcentaje de prendimiento del injerto de púa lateral en diferentes estadios fenológicos, determinándose que la época óptima coincide con el inicio de la defoliación durante los meses de febrero a abril, siendo el prendimiento del 60% sobre patrones y varetas anillados. Campbell y Lara (5) a través de diversos estudios

determinaron que son tres los factores que determinan el prendimiento o no de la púa sobre el patrón: a) Factores ambientales: siendo favorecido por los periodos que corresponden a principios y finales de la estación fría del año con días calientes, noches frías y poca humedad relativa. b) Factores fisiológicos: al respecto la mayoría de viveristas coinciden en afirmar que aquellas ramas con una mayor cantidad de carbohidratos acumulados tendrá una mayor oportunidad de prendimiento siendo favorecido por el anillado previo de las ramas y con una baja presión de la savia conducida por el tejido cambial, cuya época coincide con la indicada por Guadalupe y otros (5), además, coinciden también en señalar que las ramas juveniles tanto en púas como en patrones favorecen el prendimiento del injerto. c) Factores anatómico-morfológicos: al respecto señalan que dado que el cambium vascular de los tallos de zapote es irregular y discontinuo, especialmente en las porciones terminales de las ramas pequeñas donde los entrenudos son muy cortos, hace que sea difícil que encaje el cambium del injerto con el del patrón y probablemente es un factor importante en la dificultad de injertación. Se reporta además que la presencia de bandas fibrosas en el cortex de tallos de zapote, y sugiere que podrían ser una barrera física para la formación de raíces de estacas o acodos.

4.1.7. APLICACION E IMPORTANCIA DE LA BIOTECNOLOGIA EN EL DESARROLLO AGRICOLA:

Según Vázquez, Carrillo y Mejía (24), la Biotecnología es un conjunto de técnicas que incluyen la manipulación de organismos o parte de ellos con el fin de integrarlos al proceso de producción; la cual basa su desarrollo en importantes descubrimientos y estudios hechos en las Ciencias Biológicas como la Fisiología y la Genética.

Los estudios desarrollados sobre genética molecular por O.T. Avery (1944) y por Jim Watson y Francis Crick (1951) acerca de la estructura y composición del material genético permitieron sentar las bases de lo que muchos llaman ahora la revolución biológica. Ello también permitió darle solidez científica al término acuñado por Morgan (1901) de Totipotencia Celular, refiriéndose a la capacidad que tiene una célula de desarrollar por regeneración un organismo completo. (24).

Como producto de este desarrollo científico hubo un subsecuente desarrollo tecnológico que concluyó en la adopción y constante especialización de un conjunto de técnicas que van desde sencillas en relación a niveles de inversión, implementos y capacitación del personal como podrían ser el cultivo de meristemos y hojas *in vitro*, hasta fascinantes y complejas como la del ADN recombinante ó Ingeniería Genética.(24)

Todo este desarrollo tuvo lugar en países como Estados Unidos, Japón, Francia, entre otros, donde fueron invertidos multimillonarias sumas de dinero en su fase investigativa³ y recientemente en la comercialización de los productos al tercer mundo como un mercado potencial.(24)

En general se puede afirmar que la importancia de esta técnica radica en que a medida que en su conjunto se integren por grupos multidisciplinarios en el cultivo, se hacen más eficaces y eficientes los sistemas productivos en general. Por citar un ejemplo, en Inglaterra en 1968 fueron propagadas con un escaso número de patrones más de un millón de plantas con genotipos de alta productividad de Manzana y Melocotón en un período de un año, lo cual hubiera sido técnicamente imposible por cualquier técnica de propagación antes conocida. (24) (18)

En Guatemala cuyo sustento económico es la actividad agrícola es de esperarse que la Biotecnología alcance una gran aplicación sustentado principalmente en el mejoramiento genético de cultivos de exportación, basándose principalmente en las técnicas más sencillas y de menores volúmenes de inversión como el cultivo *in vitro* de puntas meristemáticas, yemas axilares y hojas. (24).

3.1.8. CULTIVO DE TEJIDOS:

3.1.8.1. Definición:

Hurtado, Perea, Roca y Thorpe (8, 6, 11) , definen esta técnica como el desarrollo de explantes⁴ de planta en medios sintéticos bajo condiciones controladas con el fin de desarrollar una nueva planta con características similares a sus progenitores. (13, 14).

³ Mas de 6,000 millones de dólares fueron gastados por países como Japón, Estados Unidos, Francia e Inglaterra solo en 1985. (24)

3.1.8.2. Breve Historia:

Morgan en 1901 fue el primero en acuñar el término totipotencia celular para referirse a la capacidad que tienen las células vegetales de regenerar un organismo completo aunque se desconocían los fundamentos de la genética molecular (11). En 1902, Haberlandt pudo cultivar continuamente raíces *in vitro* proporcionándoles extracto de levadura. Kooté en 1922 logró desarrollar técnicas para el cultivo de ápices de raíces para 1939 Nobecourt, Gautherier y Witc. reportaron independientemente la formación de callo en tejidos vegetales (13). Van Oberbeck en 1942 desarrolló técnicas para el rescate de embriones de cruces interespecíficos.

Para 1948, Skoog y sus colaboradores lograron a través del descubrimiento de las Citokinas y de la regulación hormonal la primera regeneración de tallos y raíces a partir de callo en tabaco (*Nicotiana glauca*, L.). lo que proporcionó las bases para la manipulación de tejidos y órganos; desarrollando el principio en el que se basa la micropropagación. En 1962 Murashigue y Skoog establecen el medio de cultivo para explantes de tabaco que sirve de base para el desarrollo de estudios posteriores en otras plantas. Guha y Maheshwary (1964) obtuvieron plantas aploides a partir de anteras. Ledoux en 1965 introdujo el DNA a células. Durante los años 70 Tabeke, Carlson y Melchers trabajaron sobre regeneración de plantas a partir de protoplastos. (15)

3.1.8.3. Ventajas y Desventajas de la Micropropagación:

La mayoría de autores en general coinciden en que son 4 las ventajas principales que otorga el cultivo de tejidos para el desarrollo de la producción: (4, 6, 8, 11, 12, 15, 16)

- a. Comercialización rápida y eficiente de una variedad con características productivas homogéneas
- b. Propagación de plantas de difícil propagación vegetativa.
- c. Propagación de clones provenientes de plantas sanas con genotipos de alta productividad.
- d. Aplicación al mejoramiento genético en periodos de tiempo relativamente cortos.

⁴ cualquier fracción de tejido, órgano o parte de la planta que pueda utilizarse para regenerar otra con características genéticas similares (11)

En cuanto a las desventajas Vázquez, Mejía y Carrillo (24) indican las siguientes:

- a. No todas las especies vegetales pueden propagarse por este método.
- b. Las plantas obtenidas por estas técnicas tienen una estrecha base genética, lo que las hace susceptibles a plagas y enfermedades.
- c. La inestabilidad genética que se obtiene donde se han utilizado altas concentraciones de hormonas.

3.1.8.4 El Cultivo de Tejidos en la Propagación clonal:

Dentro de los métodos de propagación existentes, la propagación sexual posee grandes ventajas sobre el desarrollo de los recursos fitogenéticos a través de cruzamientos específicos que permitan la formación de híbridos con buenas características productivas, siempre y cuando se garanticen adecuadamente las características genéticas de las líneas⁵ o cultivares producidos, mediante un adecuado proceso de producción y certificación de los mismos. Desafortunadamente, para muchas especies de árboles en los que el zapote no es la excepción, la producción de semillas genéticamente puras a un bajo costo y en gran cantidad es técnicamente difícil sobre todo en aquellas especies que poseen polinización cruzada (álogamas). Para estas especies la clonación⁶ de árboles maduros puede ser una buena opción que a la vez puede conjugarse con técnicas de cruzamiento dirigidas (polinización artificial). Dentro de este contexto los métodos de propagación asexuales tradicionales como la producción de estacas, acodos e injertos son efectivas cuando se requiere únicamente de un número reducido de individuos o cuando existe a disposición suficiente material vegetal para satisfacer los requerimientos de producción, sin embargo, la propagación de genotipos silvestres prometedores y el desarrollo de los mismos es bastante pausado a menos que se logre incorporar técnicas de propagación más efectivas como lo es la propagación *in vitro*, que entre otras ventajas posee: una rápida formación de clones partiendo de un solo individuo, la

⁵ Categoría básica de un cultivar que representa a una población de plantas propagadas por semillas, en la cual se controla la variabilidad genética y se le mantiene dentro de los límites apropiados para ese cultivar. (11)

⁶ Conjunto de individuos de naturaleza uniforme (que pueden ser de naturaleza quimérica), derivados originalmente de un solo individuo por medio de propagación vegetativa. (11)

conservación de individuos prometedores por largos períodos de tiempo, y el acortamiento de los programas de mejoramiento genético y de producción a gran escala : por lo que la aplicación de estas técnicas a través del desarrollo de protocolos ha sido ampliamente estudiadas en muchas coníferas, cítricos y frutales como se amplía en el inciso 4.2.2. del presente trabajo. (20) (15)

3.1.8.5. El cultivo de Tejidos en la conservación y desarrollo de Recursos Fitogenéticos:

La erosión genética causada por la destrucción del hábitat, por la selección natural y por los agentes bióticos ha acrecentado en los últimos años el interés por la conservación y desarrollo de los recursos fitogenéticos (20) (22) , la pérdida de la variabilidad existente en la naturaleza reduce el rango de trabajo de los fitomejoradores para el desarrollo de nuevas variedades puesto que el mejoramiento genético no crea variabilidad sino que trabaja sobre la variabilidad existente, de tal manera pues que los programas para el desarrollo de protocolos de propagación *in vitro* tanto de cultivares silvestres como de los comerciales también están orientados a conservarlos para su uso y desarrollo, de la misma manera en que funcionan los bancos de semilla, los jardines clonales y las área de reserva o parques nacionales. La principal ventaja que esta técnica tiene en comparación con las anteriores consiste en que el ambiente es un factor manejable, lográndose mantener plantas libres de plagas y enfermedades por periodos largos de tiempo. (20) (22)

La conservación de germoplasma utilizando el cultivo de tejidos se basa ya sea en la limitación del crecimiento conseguida generalmente, mediante la manipulación de la temperatura de incubación y medios en los que principalmente se manipulan la concentración y el tipo de azúcares así como también puede adicionarse ácido absísico; o bien , mediante la criopreservación con nitrógeno líquido a bajas temperaturas que causa el cese de todas o casi todas las reacciones metabólicas celulares. (20)

3.1.9. PROBLEMAS QUE LIMITAN EL DESARROLLO DEL CULTIVO DE TEJIDOS EN PLANTAS CON CRECIMIENTO SECUNDARIO:

De acuerdo a Randolph y otros (18) dos son los factores que afectan el desarrollo de cultivo de tejidos tanto a nivel de investigación como comercial: Los factores económicos y factores técnicos.

3.1.9.1. Factores Económicos:

A. Costos por labor:

Los costos por labor constituyen la más grande limitante para la micropropagación a gran escala de plantas leñosas, ya que estos constituyen del 60 al 80% de los costos totales. (18,8)

La forma más viable de reducir dichos costos es reduciendo al mínimo el número de subcultivos ó haciendo más eficiente el desarrollo de los tejidos para micropropagarlos. Un ejemplo ilustrativo de esto lo constituye el desarrollo de técnicas para el enraizamiento y desarrollo de brotes en puntas meristemáticas con o sin presencia de auxinas, los cuales, son provocados en diferentes medios de cultivo suplementados con Citokininas, lo que conduce a una formación rápida de brotes y a un menor número de subcultivos para la liberación de las mismas. (*Rhododendron, Kalmia, Madia, Prunus* etc.). (18,8)

B. La escala de Producción:

Si bien es cierto que miles de plantas pueden producirse a partir de un solo explante el número de subcultivos que deben realizarse para el desarrollo de los mismos hace técnicamente imposible el logro de los volúmenes considerados como mínimos, que permitan recuperar el alto costo de inversión inicial en infraestructura, insumos y mano de obra, para que la producción sea económicamente rentable. Para desarrollar esto se requiere la disposición del suficiente material vegetal considerado como mínimo para el proceso productivo a gran escala, de tal manera que puedan propagarse miles de plantas en un período relativamente corto. (8)

Un ejemplo que ilustra esto es la producción de un híbrido de melocotón y almendro donde los esfuerzos iniciales se situaron en obtener durante el verano inicial el suficiente número de puntas que

permitiera una producción semanal de 5,000 plantas durante las primeras tres semanas. llegando a producir hasta 300.000 plantas por año. (18)

3.1.2.9. Factores Técnicos:

A. Establecimiento del Cultivo:

La selección apropiada del material para el establecimiento de el cultivo continua siendo uno de los mayores problemas en algunas plantas, especialmente árboles como coníferas y algunas latifoleadas de los géneros *Juglans*, *Castanea*, *Quercus*, y *Distacia*., esto se debe principalmente a que las plantas pueden propagarse hasta que producen frutos y semillas, lo que hace muy difícil su propagación. (6) (8) (18) (21)

Como afirma Roca (20) . “ la selección del explante esta definida por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada”. si el objetivo final es la obtención de callo pueden utilizarse una amplia gama de explantes, siempre y cuando pueda inducirse en los mismos la desdiferenciación del tejido. sin embargo para técnicas de producción de órganos directamente, se sugiere utilizar partes que permanecen en crecimiento activo o en constante diferenciación como las puntas meristemáticas y las yemas axilares de los tallos. Los embriones constituyen una buena opción en el caso en que la segregación genética que se da como producto de la unión gamética no sea un factor aberrante de los plantass propagadas (20) . También debe de tomarse en cuenta que la selección del explante esta ligado a su disponibilidad en el campo, a su fácil manipulación, a su homogeneidad, a una fácil desinfección y a un período de respuesta relativamente corto. (20)(22)

B. Contaminación

Un continuo problema en las plantas con crecimiento leñoso es la contaminación durante las fases del Cultivo. En las plantas que tienen vellosidad o pubescencia en las puntas meristemáticas y hojas, que es muy común, continua siendo un verdadero problema . Quizá la parte más importante lo constituye el hecho de que en estas plantas la contaminación por bacterias pasa inadvertida la mayor parte del tiempo hasta las fases finales del cultivo. (6).(8). (18). Dado que la desinfección o esterilización del tejido influye no sólo en la contaminación o no del mismo sino también en su capacidad de regenerarse en el medio de cultivo la

técnica de desinfección utilizada debe de estar orientada a lograr un mínimo de contaminación y oxidación prematura del explante por efectos de plasmolisis. (20)

Existe una amplia gama de compuestos químicos que se pueden utilizar como desinfectantes para los explantes, siendo en la actualidad casi generalizado el empleo de etanol al 70% y del hipoclorito de sodio comercial con el 1 al 3% de ingrediente activo. Muchas veces resulta de gran utilidad la aplicación de un agente tensoactivo que disminuya la tensión superficial del agua y permita una mayor penetración del agente desinfectante como por ejemplo Tween 20 a razón de 4 a 10 gotas por litro. (22)

C. Fenolización del Tejido:

Otro problema no menos importante es la decoloración del tejido o explante por la formación de fenoles y polifenoles en el mismo, el cual es apreciado directamente en la coloración del medio a las orillas del explante. Lo cual puede ser eliminado utilizando antioxidante como el ácido cítrico (150 mg/l) sumergiendo los explantes al momento de realizar el lavado o el carbón activado en dosis de 1000 mg/l en el medio de cultivo. (6) (8) (18).

D. Estabilidad Genética:

Debido a que esta variable se origina a nivel celular, la estabilidad genética de las plantaciones micropropagadas puede ser un factor fundamental para el desarrollo de plantaciones comerciales de gran escala.

La variación genética^a y epigenética^b que se da en los explantes y propágulos, puede dar como resultado un aspecto y comportamiento diferentes a los que se producen por métodos de propagación tradicionales. (10) (18).

^a Cualquier alteración del genotipo provisto en los cromosomas ya sea por efectos de duplicación o por la acción de un agente mutagénico que da como resultado un individuo mutante. (11)

^b Es la acentuación mayor de uno de los caracteres del genotipo como producto de las condiciones del medio de cultivo la cual no se transmite durante la formación del embrión. (11)

En general la propagación con altas concentraciones hormonales puede causar una mayor variación; también influye en esto el tipo de explante que se utiliza y el tipo de desarrollo del mismo. Se ha demostrado que la propagación por medio de puntas meristemáticas y yemas axilares provocan un mínimo de variabilidad, mientras que por otro lado la formación y regeneración de callo es desventajosa para la formación de clones fieles al tipo. Para el control de dicha variación Hartman (10) propone el desarrollo de cuatro fases:

- **Selección del cultivar:** Hace referencia a la identificación de la naturaleza y caracteres genéticos lo cual determinará el sistema de propagación que se escoja.

-**Selección del explante específico y su fuente:** Asegurarse de que el material vegetal utilizado sea del cultivar correcto y que no constituya una variante de la misma.

-**Selección del procedimiento de propagación:** En general las técnicas que permiten la regeneración de plantas de manera más rápida y eficiente (cultivo de meristemas y yemas para producir organogénesis o embriogénesis directa), son preferibles a las que incluyen la regeneración del callo que cuando forma parte del proceso no debe ser subcultivado más de tres veces. (11)

-**Observación de las Plantas Propagadas:** Al final de la etapa de multiplicación, debe comprobarse por inspección la existencia de plantas aberrantes o fuera del tipo y eliminarse. Esta inspección debe hacerse en todo tiempo y clasificar por uniformidad a las plantas que deben pasar a la etapa de acondicionamiento o pretrasplante. Seguidamente deben realizarse pruebas de descendencia que garanticen que las plantas producidas son apropiadas para el propósito a que se destinan para lo cual puede recurrirse a pruebas como el análisis fenotípico de la progenie o el uso de isoenzimas como marcadores genéticos. (11)

E. Vitrificación:

La vitrificación de los explantes es un problema común en la micropropagación de plantas con crecimiento secundario que se caracteriza por la acumulación de agua y la apariencia traslúcida de las hojas. Las hojas vitrificadas tienen en apariencia un parénquima de empalizada apropiado pero poseen grandes espacios intercelulares, la cutícula cerosa es muy delgada y con pocos estomas de los cuales la mayoría no son funcionales. Bajos niveles de etileno y de vapor de agua en la atmósfera del medio de

cultivo reducen la vitrificación, también puede ser minimizada por la reducción de amonio y de los niveles de reguladores de crecimiento principalmente citocininas en el medio de cultivo aunque a su vez se reduce el número de brotes producidos. También puede ser reducida limitando la absorción de agua del explante aumentando la concentración de agar o usando otro tipo de sostén como el gelrite. (20)

3.1.10. TECNICAS DE MICROPROPAGACION PARA LA FORMACIÓN DE CLONES EN PLANTAS CON CRECIMIENTO SECUNDARIO:

3.1.10.1. Elongación de Meristemos, Puntas y Yemas Axilares:

Este tipo de propagación ocurre generalmente cuando las yemas se encuentran en dormancia, mediante la manipulación de hormonas principalmente citocininas en el medio de cultivo. Este método es más común en maderas duras que en Coníferas, su principal ventaja consiste en que se mantiene un índice adecuado de estabilidad genética; lo que es de gran ayuda para la formación de clones fieles al tipo. Se han propagado patrones de los géneros *Vitis*, *Sequoia*, y *Pinus*, entre otros. (3) (6) (15) (18)

El cultivo de meristemos apicales ofrece un rápido y eficiente método para la propagación vegetativa a gran escala de plantas así como para eliminar las infecciones virales.

Doods (6) señala que entre mayor es el tamaño del explante mayor es la probabilidad de regeneración del mismo, agrega también que un procedimiento que no envuelva el desarrollo de la fase de encallamiento es preferible, por que la inestabilidad genética que incluye el desarrollo de esta fase puede constituir un factor aberrante para las plantas formadas.

En la mayoría de los casos el medio basal MS propicia un normal desarrollo del explante bajo condiciones de cultivo estándares, generalmente se suplementan reguladores del crecimiento en especial citocininas, son agregadas también las giberelinas para la iniciación de las yemas y en algunos casos se suplementan concentraciones bajas de auxinas ya que activan la acción de la citocinina. (6) (20) (22)

3.1.10.2. Organogénesis directa:

En la organogénesis directa la iniciación de brotes es producida y posteriormente son enraizados; raramente se da el caso contrario (rizogénesis). La iniciación de brotes es producida generalmente a través de suplementar al medio Citokininas (BAP, Zeafina, Kinetina o 2IP.) sin presencia de auxinas, para su posterior traslado a medios de enraizamiento en el cual se da el proceso inverso, suplementando al medio con auxinas (ANA, ABA, 2,4D) y reduciendo o eliminando la presencia de citokininas. (4) (6) (8) (11) (18).

Como señala Roca (20) el hallazgo del factor que promovía la división celular en preparaciones degradadas de ADN identificado como cinetina por Miller condujo al estudio realizado por Skoog en el que se demostró la importancia de las proporciones de auxina:citokinina en la determinación de la respuesta morfogenética *in vitro*. Una proporción alta de auxina comparada con la de citokinina favorecía la formación de raíces, mientras que una proporción baja favorecía la formación de yemas. Por otra parte, la adición al medio de ciertos compuestos como caseína hidrolizada (CHI), modificaba la actividad reguladora de las proporciones de los reguladores antes citados, esto sugirió que el balance de ciertos factores afectaba el proceso de diferenciación entre los que destaca el explante, el medio de cultivo y el balance hormonal. En cuanto al explante el mismo autor señala que el tamaño del explante y el desarrollo fisiológico del mismo son los factores a tomar en consideración; generalmente, los explantes grandes son más difíciles de esterilizar que los explantes pequeños pero, generalmente los primeros poseen un potencial regenerador considerablemente mayor. En cuanto a la edad fisiológica del explante Roca y otros (20) indican que el potencial organogenético de un explante es inversamente proporcional a su edad fisiológica, es decir, que entre mayor sea la juvenilidad del explante mayor será la probabilidad de obtener una respuesta favorable.

En lo que al medio de cultivo se refiere Roca y otros (20) señalan que la concentración de sales en el medio junto con la adición de reguladores del crecimiento son los factores más importantes utilizándose medios como el MS, White, Gambor y WPM preferiblemente para el desarrollo de plantas con crecimiento secundario (10) (22)

Finalmente y como se amplía en el inciso 3.1.12.5.2. Roca señala que de una concentración alta de citocininas, en relación a la de las auxinas se logra la producción de órganos evitándose la fase de

encallamiento, también, señala el mismo autor que las giberelinas pueden jugar un papel importante en la producción de brotes laterales, aunque en altas concentraciones puede inhibir la diferenciación del explante.

(20)

3.1.10.3. Embriogénesis Somática:

La embriogénesis somática consiste en la formación de embriones a partir de células somáticas que se desarrollan sobre las zonas de corte del explante (embriogénesis directa) o mediante la formación y regeneración de callo (embriogénesis indirecta). Hasta el momento pocas plantas leñosas han sido propagadas por este método, sin embargo; se ha estado desarrollando y perfeccionando principalmente en coníferas como, *P. oocarpa* Shiede y *C. lucitanica* L. (6) (8) (18).

La totipotencialidad de las células vegetales cultivadas *in vitro* fue establecida por Reinert y Steward en 1958, quienes descubrieron la inducción de embriones somáticos derivados de callos producidos a partir de ápices radicales de zanahoria (*Daucus carota* L.). Steward señala que la suplementación de auxinas y de Agua de Coco son importantes para la formación de callos embriogénicos.

(20)

Roca (20) señala a el explante, el medio de cultivo y los reguladores del crecimiento como los factores que influyen en el desarrollo de esta técnica. En cuanto al explante el mismo autor señala que son pocos los explantes que tienen la habilidad de producir callos embriogénicos, comúnmente se usan plántulas en crecimiento, cotiledones, embriones tanto sexuales como apomípticos, primordios de hoja y ápices caulinares. Agrega el mismo autor que se a logrado producir embriones en plantas con crecimiento secundario a través del empleo de tejido nucelar y óvulos inmaduros en especies de los géneros *Mangifera*, *Citrus*, *Eugenia* y *Mirciaria*.

En cuanto a los medios de cultivo Roca (20) señala que el medio MS con algunas modificaciones en cuanto al aumento de la concentración de sales y de azúcares ha presentado resultados satisfactorios para el desarrollo de programas de investigación.

Finalmente, Roca y otros (20) (22) indican que la producción de embriones somáticos esta ligado a la adición de Auxinas como el ANA, AIB, y el 2-4D, sin embargo; en algunos casos como en los que se usan embriones se hace necesario la aplicación de una citocinina al medio en bajas concentraciones.

3.1.11. FASES DEL CULTIVO DE TEJIDOS:

3.1.11.1. Establecimiento:

De acuerdo con Harman (11) los factores que afectan el desarrollo de esta etapa son: a) La selección del explante. b) la eliminación de los contaminantes y c) las condiciones del cultivo.

En general como afirma el autor citado anteriormente los tejidos más jóvenes como puntas meristemáticas axilares y terminales se regeneran mejor que tejidos más viejos como hojas u órganos de almacenamiento. (3)

La selección del explante debe también estar orientada al tipo de técnica que se va a utilizar en base al tipo de respuesta que se desee y el fin de la propagación. Por ejemplo, para la formación de clones en plantas con crecimiento secundario la inducción y regeneración de callo no es aconsejable por la variabilidad genética que el mismo provoca. (6) (8) (21).

En cuanto a la desinfección se afirma que el empleo de esta técnica de una forma adecuada influye no sólo en la no contaminación del explante en el medio sino en la capacidad del mismo para regenerarse, a medida que el tejido es dañado en dicho proceso. En general la utilización de hipoclorito de sodio comercial (5.3% de ingrediente activo) en concentraciones del 10, 15 y 20% durante 10 o 15 minutos de tiempo causa un menor daño que la inmersión de alcohol. al plasmolizarse las células en menor grado. (6) (8) (17)

Finalmente en relación al medio de cultivo y a las condiciones del mismo para el crecimiento, Hartman (11) afirma que los elementos del medio de cultivo están condicionados por la clase de respuesta que se necesite, siendo de mayor importancia la regulación hormonal de los mismos. Afirma también, que la luz y la temperatura no constituyen un factor crítico dentro de esta fase y que por lo común se utiliza una

temperatura promedio entre 20 y 25 grados centígrados y un fotoperiodo de 16 horas con una intensidad de 1,000 lux.

3.1.11.2. Multiplicación:

La función de esta etapa es el incremento de número de propágulos para su posterior enraizamiento y la formación de plantas.

A partir de los explante, o callos producidos durante la primera fase se cortan y se siembran los explantes en un nuevo medio o bien se regenera el callo producido en medios de regeneración. (6) (11)

La tasa de multiplicación puede variar de 5 a 50 dependiendo de la especie y del método de propagación. También debe tomarse en cuenta en esta fase la frecuencia de transferencia ya que esta influye en el desarrollo de las plantas posteriores y en el período de recuperación. (11)

Finalmente, es importante considerar el tamaño de los recipientes de cultivo que esta en función de la clase de explante que se produzca y del espacio requerido para la proliferación. (11)

3.1.11.3. Acondicionamiento:

El desarrollo de esta etapa consiste en preparar a la planta para su traslado y establecimiento en el campo definitivo fuera del medio artificial de crecimiento. En consecuencia el cambio principal que esta etapa persigue es el desarrollo de las condiciones que permitan la iniciación de las raíces y el alargamiento del tallo, lográndose básicamente por la reducción de citocininas y el aumento de la provisión de auxinas. (11).

La acción de fluroglucocinol ha mejorado el enraizamiento y reducido el encallamiento provocado por la concentración de auxinas (6) (8) (11) (18), debe tomarse en cuenta también que la planta deberá pasar en la fase subsecuente de la condición heterótrofa al no realizar fotosíntesis a una autótrofa, lo que implica que deberá tener la capacidad de formar hojas nuevas que sean también resistentes a la desecación, por lo que generalmente se aumenta la concentración de agar de 1 a 1.2%. (11)

3.1.11.4. Trasplante:

La fase de trasplante abarca la transferencia de las plantas del medio aséptico de cultivo sintético a su medio natural. El objeto primordial consiste en lograr una adecuada aclimatación de la planta por tanto deben pasar a su condición de autótrofas, y tener un sistema radicular bien desarrollado. (6) (8) (11).

Tres elementos son importantes para el desarrollo con éxito de esta fase: a) Una humedad relativa alta para evitar el desecamiento de la planta. b) Dar a la planta un medio de crecimiento adecuado en relación al contenido de arena limo y arcilla, que le permita un adecuado desarrollo de las raíces, con un buen drenaje, y c) El control de plagas y enfermedades mediante una adecuada desinfección del suelo y un constante monitoreo y control de las mismas durante el crecimiento. (8) (11)

3.1.12. MEDIOS DE CULTIVO:

El medio de cultivo además de proveer el sostén y los elementos para el desarrollo de la planta, como el suelo lo haría en condiciones naturales contiene también sustancias orgánicas que regulan el crecimiento, desarrollo y diferenciación del explante, y que hacen posible el desarrollo de la planta en condiciones asépticas. Dichos elementos varían según el tipo de planta y técnica de cultivo que se esté utilizando. (6) (8) (11)

3.1.12.1. Sales Inorgánicas:

Estas sustancias proporcionan los macro y microelementos que la planta necesita para un desarrollo normal, las cuales pueden ser preparadas en soluciones concentradas y guardadas en refrigeración. (8) (11)

3.1.12.2. Compuestos Orgánicos:

A. Carbohidratos:

El agregar carbohidrato tiene como objetivo principal proveer de una fuente de carbono a las plantas para lo cual se utiliza sacarosa entre el 2 y 4%. En algunos casos el contenido puede ser mayor cuando se trabaja con embriones jóvenes o se trata de eliminar la dormancia en meristemos axilares y puntas. (11).

B. Vitaminas:

La tiamina, el ácido nicotínico y la piridoxina son generalmente añadidos al medio en dosis de 5 mg/l, ya que son requeridos en los procesos metabólicos para la elaboración de tejidos. En algunos casos suele agregarse ácido pantoténico y biotina en dosis de 0.1 mg/l. Todas las vitaminas generalmente son guardadas en soluciones concentradas de 100x. (8) (11)

C. Reguladores del Crecimiento:

El crecimiento de las plantas está controlado por procesos fisiológicos regulados por varios compuestos conocidos como reguladores u hormonas. Los tres tipos de hormonas más comúnmente utilizadas en la propagación *in vitro* son: las Auxinas, las Citocininas, y las Giberelinas, las cuales determinan el tipo de respuesta que se obtiene del explante en el medio de cultivo. (6) (8) (11)

C.1. Citocininas:

Las citocininas fueron descubiertas por Skoog como parte del material constituyente del ARN, sobre un codón en posición adyacente a su anticodón. Son sustancias que interfieren en los procesos de división celular y el retardo de la senescencia en las partes maduras de la planta. Se sintetizan en los tejidos meristemáticos principalmente en los de las raíces. Las citocininas de los tallos, yemas, hojas y frutas no son traslocables, es decir, no se desplazan de su sitio de síntesis tienen al contrario un efecto movilizador de nutrimentos hacia los órganos donde se encuentran. (6) (8) (11)

Se considera que su modo de acción es a través de la síntesis de proteínas específicas para el desencadenamiento de la mitosis. Dentro de las citocininas la Kinetina ha recibido mucha atención como una sustancia estimuladora de la división celular; no se ha demostrado que esté presente como un compuesto natural y generalmente se reconoce como un artefacto. Desde el aislamiento de la Kinetina en 1955 se han aislado varias sustancias a partir de preparaciones de ADN, las cuales ocurren naturalmente. Actualmente, las citocininas comprenden sustancias de división celular, sustancias promotoras, y las adenilcitocininas. Dentro de las frecuentemente utilizadas están la Zeatina, la Kinetina, el BAP, BA y 2IP usadas en dosis de

0.5 a 5mg/l. . Dentro de estas el BAP , se utiliza actualmente más que la Kinetina y la Zeatina. ya que es un compuesto muy activo y se encuentra disponible fácilmente a un precio razonable.(8)(20)

C.2. Auxinas:

Las auxinas fueron descubiertas por Fritz Went en Inglaterra, como sustancias difusibles que propiciaban el alargamiento celular, sin embargo fue hasta 1930 cuando se conoció la estructura del Ácido Indolacético (AIA). (3)

En la planta la auxina no se acumula indefinidamente. Su concentración esta controlada por enzimas del tipo peroxidasas, las cuales producen en presencia de oxígeno la oxidación de la auxina . Se sintetizan en el ápice del tallo especialmente en meristemas y hojas jóvenes. De los sitios de síntesis, la auxina migra hasta las raíces . En las plantas jóvenes su transporte es polar (del ápice hacia la base del órgano). (8) (22)

Dentro de las propiedades fisiológicas de las auxinas están:

- a. Acción sobre el crecimiento celular: Estimula el crecimiento de tallos y hojas, pero en concentraciones diferentes. En la raíz su efecto es generalmente inhibitorio con excepción de concentraciones muy bajas.(20) (22)
- b. Efectos sobre el desarrollo: Las auxinas controlan la iniciación de raíces (rizogénesis), el desarrollo del pericarpio de los frutos, la formación de tejido conductor, el desarrollo de yemas y la abscisión de las hojas.(22.)
- c. Efectos sobre la dominancia apical: La auxina por su síntesis en el ápice, contribuye a mantener la dominancia apical.(3)
- d. Efecto sobre los tropismos: Si la planta se somete a iluminación lateral, esta se orienta en la dirección de la luz (fototropismo). Esta inclinación se debe a una migración de la auxina de la parte iluminada hacia la parte oscura de la planta. La parte de la planta expuesta a la luz tiene entonces menor cantidad de auxinas y se divide más lentamente que la parte no iluminada.

Las auxinas comprenden el ácido naftalenoacético (ANA), usado en dosis de 0.1 a 10mg/l., el ácido indolacético usado en iguales proporciones que el anterior el CPA (Acido 4 fenoxiacético) y el 2,4 D. en dosis de 0.05 a 0.5 mg/l.

C.3. Giberelinas:

Las giberelinas fueron descubiertas cuando se encontró que la aplicación de extractos de un hongo fitopatógeno (*Gibberella fujikuroi* S.V. Mitch) duplicaba el efecto de la enfermedad conocida como acame o vuelco del arroz (*Oriza sativa* L.). Su principal actividad consiste en promover el alargamiento de tallos yemas axilares y puntas meristemáticas. Las giberelinas también toman parte en la floración.

A diferencia de las auxinas las giberelinas parecen moverse por toda la planta tanto hacia arriba como hacia abajo. El ácido giberélico (GA3) es usado para el elongamiento de yemas y puntas meristemáticas en dormancia en dosis de 0.05 a 2 mg/l. (3)

En la mayoría de los cultivos, los niveles de AG3 superiores a 1.0 mg litro son tóxicos, y son rápidamente desnaturalizados por la acción de la temperatura, por lo que se aconseja su filtración. (20) (27)

C.4. Interacción hormonal en cultivos *in vitro*:

En algunos casos el explante puede exhibir algún tipo de respuesta sin suplementarle ningún tipo de regulador al medio basal, en otros, la suplementación de un sólo tipo puede inducirlo, sin embargo; la manipulación de los diferentes tipos de respuesta orientados a un tipo específico de propagación, están determinados por un adecuado balance e interacción de los diferentes tipos de hormonas y sus dosis.

El tipo de interacción más ampliamente estudiado a través del desarrollo de técnicas *in vitro* en plantas de los géneros *Coffea*, *Nicotiana* y *Daucus* ha sido la de auxinas y citocininas. Se sabe que de acuerdo a la condición fisiológica y la etapa fenológica del explante, que proporciones altas de citocininas vs auxinas (3:1 mayoritariamente) son eficientes para la producción de brotes a través de tejidos meristemáticos, a los cuales se hace enraizar aumentando la concentración de auxinas y disminuyendo las citocininas.(20) (22) Por el contrario, altas concentraciones de auxina en relación a la citocinina provocan el desarrollo de callos embriogénicos sobre explantes como cotiledones, tejido nucelar, embriones

apomípticos y ápices caulinares. Callos o brotes pueden ser inducidos sobre meristemas apicales o axilares en proporciones más o menos equilibradas atendiendo a la concentración hormonal sobre los mismos. (20) (22)

Las giberelinas pueden actuar conjuntamente con las citocininas en el desarrollo y elongación de meristemas apicales o axilares siendo en algunos casos necesario la adición de bajas concentraciones de auxina. (20) (22)

Se sabe que generalmente las giberelinas inhiben la acción auxínica puesto que retarda la senescencia y maduración de las células a la vez que induce el rompimiento del letargo, que son funciones fisiológicas reguladas por hormonas del tipo auxínico, sin embargo, se sabe que en concentraciones bajas y proporciones equilibradas aumentan el efecto de la citocinina para la elongación de meristemas apicales y la formación de brotes. (20) (22)

D. Antioxidantes:

A menudo se emplean sustancias como el ácido cítrico (150mg/l) o el ácido ascórbico (10mg/l) como un factor importante contra la oxidación prematura del explante ya sea en los lavados preliminares o directamente en el medio de cultivo. También puede usarse el carbón activado en dosis de 1000 mg/l. (6) (8) (11).

E. Complejos Naturales:

Materiales de composición desconocida de origen natural son usados en ocasiones para provocar crecimiento. Entre ellos destacan los hidrolizados de proteína obtenidos de la caseína en dosis de (30 a 300 mg/l), el agua de coco de 10 a 20% en relación peso sobre volumen y el extracto de levadura de 50 a 5.000 mg/l. (6) (8) (11)

3.1.12.4. Sostenes Inertes:

De acuerdo a Hartman (11) el agar es el medio de sostén más adecuado por que posee dos propiedades esenciales: a) Se derrite al calentarlo pero a temperatura ambiente se enfria formando un gel semisólido y b) Es en esencia biológicamente neutro.

De acuerdo al mismo autor (11), para un adecuado uso del mismo en la elaboración de medios dos factores son importantes: a) La concentración, en general concentraciones entre el 0.5 y 0.6% son recomendables pues provocan un adecuado contacto entre el medio y la planta y un correcto intercambio de nutrientes. b) El pH: En general el pH adecuado es entre 5.0 y 6.0. pH muy ácidos provocan que el agar no se solidifique bien y que tiendan a deteriorarse con el calor.

3.2 MARCO REFERENCIAL:

3.2.1. PROPAGACION *IN VITRO* EN PLANTAS CON CRECIMIENTO SECUNDARIO:

Existe actualmente varias especies con crecimiento secundario, ya sea ornamentales, frutales o de carácter forestal, que han sido propagadas por medio del cultivo de tejidos, cuyo margen es ampliado a medida que los factores biológicos o económicos que lo imposibilitan se superan en el desarrollo de la técnica.

Los exitosos experimentos realizados en la especie *Populus tremuloides* L. (1967) favorecieron grandemente la expansión en la aplicación de la técnica de cultivo de tejidos para la propagación de plantas con crecimiento secundario, siendo los árboles frutales donde este a logrado su mayor desarrollo y beneficio. (8) (18) Dentro de éste contexto, el enraizamiento *in vitro* de manzana y melocotón realizados en Bélgica e Inglaterra fueron quizá los primeros a gran escala basados en los estudios realizados por Jones en la eficiencia del fluroglucocinol para la iniciación de puntas y el enraizamiento de patrones. Durante el mismo período el desarrollo de técnicas sobre el cultivo de meristemos apicales tuvo lugar en muchas especies y cultivares del género *Prunus*, con el uso de Citoquininas, las cuales fueron aplicadas posteriormente para melocotón, cereza y ciruela. (18)

Especies frutales han sido propagadas *in vitro* en escala limitada con fines de mejoramiento genético, entre ellas se encuentran la mora, uva y avellana, siendo la mora actualmente propagada para establecer plantaciones comerciales. (18),(7).

El Mango (*Mangifera indica* L.) ha sido propagada a través de la técnica conocida como el cultivo de embriones en medios MS suplementados con Sucrosa 0.18M, Glutamina 2.7mM, Acido Ascórbico 0.5mM y de 4.5 a 9 Micromoles de 2,4-D. Dicha técnica ha sido implementada para varias especies y cultivares del género Citrus. (8,18).

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es producida por el cultivo de rebrotes durante la poda para la formación y regeneración de callo en medios MS, suplementados con Auxinas y Citoquininas.(8)

Algunas especies como el café (*Coffea arabica* L.), ha sido propagada por distintas técnicas utilizando distintos tipos de explantes, ya sea para producir organogénesis, embriogénesis somática o formación y regeneración de callo en medios MS y WPM suplementados con auxinas como IBA, IAA y BA, para la producción de embriones somáticos, giberelinas (GA3) para la iniciación de yemas axilares, y citoquininas (Kinetina) para formación de brotes a partir de puntas meristemáticas.(6,18)

Para el caso de las plantas ornamentales la adopción de las técnicas de cultivo de tejidos fue más rápida y eficiente lo que favoreció grandemente el desarrollo de laboratorios comerciales. El uso de cultivo de tejidos para la propagación de *Rhododendrom* es quizá el ejemplo más exitoso, ya que este es actualmente el método más utilizado alrededor del mundo. Los estudios realizados por Anderson sobre *Rhododendrom* fue la culminación de una investigación iniciada en 1968, sobre reguladores de crecimiento comerciales, que resultó en la rápida adopción de dos grandes grupos de reguladores (auxinas y citoquininas), en los que se basa la técnica de la micropropagación.(18).

Con la refinación y adaptación de estas técnicas se lograron propagar alrededor de 1 millón de plantas por año. Otro caso similar se baso en la propagación de patrones de rosa (*Rosa sp*), por medio de yemas axilares donde se produjeron alrededor de 500.000 plantas sobre medios MS suplementados con kinetina y ácido gibérelico (18,8).

Para plantas forestales el uso del cultivo de tejidos como una técnica de propagación ha sido más pausado. Plantas de *Pinus radiata* HVK son ahora propagadas en Finlandia en cantidades modestas.

Franco y Schwarz (18) lograron la regeneración de plantas por organogénesis utilizando como explante cotiledones en *P. oocarpa* Shied. y *C. lusitánica* L.

Un estudio de importancia en este campo lo es también el realizado por Thomas Sanko y Marci Stefani para la propagación *in vitro* de *Oxidendrum arboreum* L. sobre árboles maduros utilizando como medio WPM con diferentes concentraciones de Zeatina, ellos demostraron que existe una relación directamente proporcional entre la concentración de esta citoquinina y el número de brotes producidos, el cual se ve disminuido a medida que se aumenta el contenido de auxinas. La concentración que provocó el mayor número de brotes fue de 4 micromoles/litro.(21).

Astroga y Escalant (7) lograron propagar el zapote (*Pouteria sapota* L. Cronquist) utilizando embriones, los cuales eran desarrollados sobre medios basales MS en los que se adicionaba 0.5 mg/lit de BAP y 1000 mg/lit de carbón activado. Para luego micropropagarlas en medios de cultivo que contenían 1 mg/lit de BAP y 1000 mg lit de carbón activado.

3.2.2. FASES PARA EL DESARROLLO INICIAL DE UN PROTOCOLO:

El desarrollo de la fase inicial de un protocolo consiste en el establecimiento y desarrollo del explante, para lo cual la mayoría de textos definen 5 pasos. (8)

a) Definición de la técnica a utilizar: De acuerdo a esto, el tipo de técnica a utilizar debe estar orientada al objetivo que persigue la propagación. Por ejemplo, para la propagación de clones y conservación de germoplasma son adversas aquellas técnicas que inducen a la formación de callo por que generan variabilidad. (22)

b) Definición del tipo de Explante: El tipo de explante a utilizar debe de estar orientado a la facilidad de maniobrarlo y a la disponibilidad del mismo, además que se debe tomar en cuenta que no cualquier explante responde a un tipo de técnica definida. (20) (22) (11)

c) Técnica de desinfección: La técnica de desinfección debe estar destinada a reducir al mínimo la contaminación del explante durante la manipulación del mismo evitando al máximo el daño al tejido causado por la acción de los agentes desinfectantes. (11)

d) El medio de propagación: En cuanto a la definición del medio se señala que existen varios medios basales utilizados para la propagación de plantas entre los que destacan el MS, Gambor, B5 y el WPM (11) (22). Sin embargo es el manejo de la interacción hormonal el que limita y condiciona en la mayoría de los casos el tipo de respuesta y desarrollo del explante, por lo que es en base a ello que se diseñan las principales modificaciones a estos para el desarrollo de la investigación inicial que pretende la formación de un protocolo. Para ello se propone la evaluación en un ensayo general inicial de niveles de concentración hormonales altos, moderados y bajos de los distintos tipos de reguladores utilizados y su interacción en base al tipo de respuesta que se pretende, de tal manera que permita estudiar cuales son los rangos en que se efectúa algún tipo de respuesta y, conforme a ello desarrollar ensayos que permitan estrechar los mismos para optimizar la respuesta y desarrollo del explante. De no encontrarse respuesta en el ensayo general debe redefinirse la técnica o el explante utilizado o bien utilizar rangos mucho más amplios en base a la concentración inicial de las hormonas. (22)

e) Condiciones de Cultivo: Generalmente para la mayoría de los casos se sugieren fotoperiodos de 16 horas con intensidad de 1000 lux y una temperatura de 25 grados centígrados.

3.2.3. PROCEDENCIA Y TIPO DE MATERIAL:

El material fue colectado en la finca Santa María Buena Vista en el municipio de Guanagazapa, Escuintla, a 62 km. de la ciudad capital, con una altura promedio de 700 m.s.n.m. en la zona ecológica del Bosque Húmedo Subtropical Cálido.

El material fue colectado de una plantación en crecimiento entre 4 y 6 años de edad procedente de la finca brillantes de una variedad silvestre de individuos promisorios.

3.2.4. AREA EXPERIMENTAL:

El estudio se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos perteneciente a la Subárea de Manejo y Mejoramiento de Plantas de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala ubicado en el edificio T-8, tercer nivel en la Ciudad Universitaria Zona 12 de la misma ciudad.

4 OBJETIVOS

- 4.1. Conocer la respuesta de meristemos terminales de zapote cultivados *in-vitro* en diferentes medios de cultivo, utilizando los medios basales Murashigue y Skoog (MS) y Woody Plant Medium (WPM), con distintas concentraciones de auxinas, citocininas y giberelinas.
- 4.2. Conocer la respuesta de explantes de hoja de zapote cultivadas *in vitro* en diferentes medios de cultivo.

5.METODOLOGIA

5.1. Selección de los explantes:

Los explantes fueron seleccionados con base en: Respuesta a evaluar: pruebas preliminares: observaciones anatómicas de tejido en diferentes partes de la planta: observaciones en el campo y revisión bibliográfica. Seleccionándose las puntas meristemáticas de las ramas plagiotrópicas⁹ y hojas en crecimiento entre 2 y 8 cm de largo por 2 cm. de ancho .

Tanto las puntas meristemáticas como las hojas jóvenes son fáciles de manipular y se encuentran en adecuada disposición dentro del árbol. además. poseen tejidos meristemáticos con células parequimatosas que pueden ser capaces de diferenciarse o desdiferenciarse con mayor facilidad.

Las razones para no haber seleccionado otro tipo de explante son las siguientes:

Las yemas axilares. debido a que poseen una zona meristemática escasa. recubierta por pubescencia. son más difíciles de extraer y desinfectar. además que de acuerdo a observaciones de campo se pudo determinar que en su mayoría eran de carácter floral.

El tallo aún en ramas juveniles posee cambium ya diferenciado lo que limita su capacidad de responder al cultivo *in vitro*. además de no ser utilizado en estudios anteriores de propagación clonal.

Las puntas meristemáticas de las raíces son de difícil extracción y de escasa disponibilidad dentro del árbol. los embriones dado el tipo de polinización predominantemente alogámica son descartados para la formación de clones debido a la variabilidad genética que se origina de este tipo polinización. sin embargo dado el potencial organogenético que este tipo de explante tiene: es de vital importancia desarrollar estudios de biología floral y de programas de cruzamientos dirigidos. que permita el desarrollo de semilla certificada que garantice genotipos uniformes para que puedan ser objeto de estudio en su respuesta *in-vitro*. Se descartaron también las estacas de plántulas y los cotiledones. (22) (20)

⁹ Región meristemática que se encuentra sobre la punta apical de las ramas que crecen en posición horizontal en relación al tallo principal ortotrópico (25)

Se desconoce hasta la fecha la disposición de embriones apomípticos que partan ya sea de tejido nucelar o de óvulos no fecundados para su utilización en el desarrollo de plantas haploides y formación de clones por lo que también se descartaron. (20)

Finalmente el cultivo de anteras dado el amplio rango de variabilidad que se obtiene en su propagación *in vitro* y al no reportarse trabajos anteriores donde fueran utilizadas para plantas con crecimiento secundario fueron también descartadas. (15)

5.2. Colección del Material:

La colección de los explantes se realizó entre las 7:00 y 9:00 horas para trabajarlas en horas de la tarde, y con ello evitar la fenolización que durante el transcurso de las pruebas preliminares se pudo constatar que se produce después de 24 horas del corte del mismo. Las puntas de las ramas que contenían el meristemo terminal y las hojas en crecimiento se cortaron con un largo aproximado de 5 centímetros, se colectaron en bolsas plásticas con papel absorbente humedecido, y se transportaron en condiciones de baja temperatura, en hielera.

5.3. Selección de los medios Basales:

Existen diferencias significativas para la formación de brotes en plantas con crecimiento secundario entre diferentes medios de cultivo suplementados con la misma cantidad de hormonas (6, 8, 12, 17, 18, 21), la diferencia principal como se pudo constatar esta ligada a la suplementación de sales. El medio MS. (Murashige y Skoog) ha sido utilizado con éxito en la mayoría de los casos con modificaciones, reduciendo al 50% el contenido normal de sales (11). Partiendo de ello los investigadores desarrollaron el medio WPM (Woody Plant Medium): cuya principal diferencia consiste en la reducción de sales y en la sustitución del nitrato de amonio por el nitrato de calcio como fuente de nitrógeno (ver apéndice I), por lo que ambos fueron objeto de análisis en el presente trabajo.

5.4. Elaboración de los Medios:

Las soluciones concentradas fueron elaboradas en base a las concentraciones descritas tanto para medios MS como WPM para macroelementos, microelementos, myo-inositol, y solución de hierro (ver apéndice 1). De las soluciones concentradas se extrajeron los volúmenes deseados para la elaboración de las mezclas y se adicionaron las dosis hormonales a evaluar para los distintos tratamientos contemplándose para el GA3 un 90% de desnaturalización al ser autoclaveada (20), posteriormente se agregó la sucrosa en las dosis descritas para cada medio y se balanceo el pH a 5.6. para los medios de desarrollo se agregó agar al 0.6%. Posteriormente se transfirió a los tubos de ensayo o frascos de vidrio con la cantidad de medio utilizada por unidad experimental y se autoclavearon a una temperatura de 130 grados centígrados y 17.31 kilogramos por centímetro cuadrado, durante 15 minutos.

5.5. Procedimiento y época de siembra:

De la misma manera que ocurre en el caso de la injertación (ver inciso 3.1.6) se pudo observar durante el desarrollo de pruebas preliminares durante los meses de agosto y septiembre de 1995 que el desarrollo del explante durante la época de precipitación activa se ve seriamente limitado por la alta concentración de látex dentro del tejido, la baja concentración de carbohidratos y la mayor incidencia de plagas y enfermedades, que como resultado de la creciente precipitación, temperatura y humedad relativa tienden a estar presentes en mayor grado en forma de esporas sobre la pubescencia de los meristemas. Para solventar ese problema se decidió realizar el estudio durante enero y mayo del presente año que coinciden con el inicio de la abscisión de las hojas y el inicio de la nueva brotación, que de acuerdo a revisión bibliográfica son las épocas más adecuadas para la propagación vegetativa.

La siembra se realizó en la cámara de flujo laminar, la cual fue desinfectada una hora antes de cada sesión de trabajo, desinfectándola con alcohol etílico al 70%. Para el manejo del tejido se utilizó probetas, frascos, agua estéril, y cajas petri previamente autoclaveadas, además de asa, pinzas y bisturi los cuales serán flameados en el mechero cada vez que se trabajó un explante.

5.5.1. Subcultivos:

Tanto para los meristemos como para los explantes de hoja se realizaron 3 subcultivos con un intervalo de ocho días entre la siembra y cada subcultivo.

5.5.2. Condiciones del cultivo:

Las siembras en los medios de cultivo se mantuvieron en el cuarto de incubación con un fotoperíodo de 16 horas de luz. La fuente de luz fueron lámparas fluorescentes de luz blanca de 1.000 lux de intensidad. La temperatura media fue de 22 grados centígrados.

5.6. DESINFECCION:

La técnica de desinfección del tejido empleado influye no sólo sobre la contaminación del explante sino también en la capacidad de regeneración del mismo por daños causados al tejido. (20) (6)

Se utilizaron pruebas preliminares para la desinfección de explantes, los resultados de las cuales se muestran en el apéndice 2. Se limpió el material vegetal con cepillo dental y detergente 5 veces para eliminar la suciedad; removiendo la corteza del tallo para eliminar la pubescencia, se cortó el mismo, se eliminó la pubescencia remanente y se sumergieron los explantes en las distintas soluciones desinfectantes (ver apéndice 2), de las cuales se seleccionaron aquellas en las que se presentó el menor número de explantes contaminados y oxidados.

Para la desinfección de los meristemos se utilizó alcohol al 70% por un minuto más hipoclorito de sodio al 0.53 % por diez minutos ó hipoclorito de sodio al 1.06 % por quince minutos, efectuando tres lavados, sumergiendo los explantes en una solución de ácido cítrico a 150 mg/lit. y agregando 1000 ml de carbón activado al medio de cultivo. (ver apéndice 1, cuadro 20).

Las hojas entre 2 y 4 cm. de largo fueron desinfectadas con alcohol al 70% por 1 minuto más hipoclorito de sodio al 1.06% por diez minutos ó alcohol al 70% por 2 minutos más hipoclorito de sodio al 1.06% por 10 minutos. (ver apéndice 1 cuadros 21,22)

5.7. TRATAMIENTOS:

5.7.1. MERISTEMOS:

5.7.1.1. Respuesta de los meristemos a dos diferentes medios basales, con dos tipos de reguladores del crecimiento en diferentes concentraciones.

Para conocer la respuesta de los meristemos a la elongación y desarrollo se realizó un ensayo general en el cual se utilizó bencilaminopurina (BAP) en 3 niveles de concentración (0.5, 2, y 5 mg/l) alternados con dos concentraciones de ácido giberélico GA3 (0.1 y 0.5 mg/l) en dos diferentes medios de cultivo (MS y WPM) los cuales se describen en el cuadro 2.

5.7.1.2. Respuesta de los meristemos terminales y las puntas meristemáticas a medios de inducción con dos niveles de ácido giberélico (GA3) y medios de desarrollo suplementados 5.7.1.2. Respuesta de los meristemos y las puntas meristemáticas a medios líquidos con ácido naftalenacético (ANA), bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico GA3.

Se estudió la respuesta que dos diferentes tamaños de explantes podrían tener sobre el desarrollo del mismo, estudiando a su vez el efecto que un medio líquido de inducción con carbón activado agitado en un agitador horizontal a 100 rpm durante ocho días y dos concentraciones de GA3 podrían tener para un mejor lavado de los fenoles producidos, una elongación inicial y una mejor absorción de los componentes del medio. Finalmente se evaluó un medios sólidos de desarrollo suplementados con auxinas, citoquininas, y giberelinas en similares proporciones. (ver cuadro 3)

Cuadro 2: Tratamientos utilizados para el estudio de la respuesta de los meristemos, en dos diferentes tipos de medios basales con dos diferentes clases de hormona en diferentes concentraciones.

1.	M.S.	BAP 0.5mg l	---
2.	M.S.	BAP 2mg l.	---
3.	M.S.	BAP 5mg l.	---
4.	M.S.	BAP 0.5mg l	GA3 0.1 mg l
5.	M.S.	BAP 2mg l	GA3 0.1 mg l
6.	M.S.	BAP 5mg l	GA3 0.1 mg l
7.	M.S.	BAP 0.5mg l	GA3 0.5 mg l
8.	M.S.	BAP 2mg l	GA3 0.5 mg l
9.	M.S.	BAP 5mg l	GA3 0.5 mg l
10.	M.S.	----	GA3 0.1mg l
11.	M.S.	----	GA3 0.5mg l
12.	M.S.	----	---
13.	WPM	BAP 0.5mg l	---
14.	WPM	BAP 2mg l	---
15.	WPM	BAP 5mg l	---
16.	WPM	BAP 0.5mg l	GA3 0.1mg l
17.	WPM	BAP 2mg l	GA3 0.1mg l
18.	WPM	BAP 5mg l	GA3 0.1mg l
19.	WPM	BAP 0.5mg l	GA3 0.5mg l
20.	WPM	BAP 2mg l	GA3 0.5mg l
21.	WPM	BAP 5mg l	GA3 0.5mg l
22.	WPM	---	GA3 0.1mg l
23.	WPM	---	GA3 0.5mg l
24.	WPM	---	----

Cuadro 3: Tratamientos utilizados para el estudio de la respuesta de los meristemos y las puntas meristemáticas en medios líquidos de iniciación:

Medio Líquido		
No	Tipo de Explante	Tratamiento en Medio basal MS
1	Meristemo	0.5 mg lt de GA3 (a)
2	Meristemo	0.1 mg lt de GA3 (b)
3	Punta meristemática	0.5 mg lt de GA3 (a)
4	Punta Meristemática	0.1 mg lt de GA3 (b)
Medio Sólido		
No	Tipo de Explante	Tratamiento en Medio basal MS
1	Meristemo	(a) (0.5mg lt ANA + 0.5mg lt BAP + 0.5mg lt GA3)
2	Meristemo	(b) (0.5mg lt ANA + 0.5mg lt BAP + 0.5mg lt GA3)
3	Punta Meristemática	(a) (0.5mg lt ANA + 0.5mg lt BAP + 0.5mg lt GA3)
4	Punta Meristemática	(b) (0.5mg lt ANA + 0.5mg lt BAP + 0.5mg lt GA3)

5.7.1.3. Respuesta de las puntas meristemáticas de zapote a dos medios basales de iniciación con cuatro niveles de ácido giberélico (GA3) y dos medios basales de desarrollo con tres tipos de reguladores del crecimiento en diferentes concentraciones:

Con base a lo observado en el segundo estudio se determinó la respuesta que las puntas meristemáticas tenían sobre dos diferentes tipos de medios basales de inducción con cuatro diferentes concentraciones de GA3 y sobre dos diferentes medios basales de desarrollo suplementados con tres tipos de hormonas (auxinas, citocininas y giberelinas) en diferentes concentraciones (Ver cuadros 4 y 5)

Cuadro 4: Medios basales de iniciación con 4 niveles de GA3 utilizados sobre puntas meristemáticas.

No.	Medio Base	Concentración de GA3
1	MS	1mg/lit de GA3
2	MS	0.8mg/lit de GA3
3	MS	0.5mg/lit de GA3
4	MS	0.2mg/lit de GA3
5	WPM	1mg/lit de GA3
6	WPM	0.8mg/lit de GA3
7	WPM	0.5mg/lit de GA3
8	WPM	0.2mg/lit de GA3

Cuadro 5: Medios basales de desarrollo con tres diferentes tipos de hormonas en diferentes concentraciones usados en las puntas meristemáticas:

No.	Medio Base	Concentración de Hormonas
1	MS	Sin Hormonas
2	MS	1 mg/lit de BAP + 0.5mg/lit de GA3 + 0.5mg/lit de ANA
3	MS	2 mg/lit de BAP + 0.5mg/lit de GA3 + 0.5mg/lit de ANA
4	MS	1 mg/lit de BAP + 0.5 mg/lit de ANA
5	MS	2 mg/lit de BAP + 0.5 mg /lit de ANA
6	WPM	Sin Hormonas
7	WPM	1 mg/lit de BAP + 0.5 mg/lit de GA3 +0.5 mg/lit de ANA
8	WPM	2 mg/lit de BAP + 0.5 mg/lit de GA3 + 0.5 mg/lit de ANA
9	WPM	1 mg/lit de BAP + 0.5 mg/lit de GA3
10	WPM	2 mg/lit de BAP + 0.5 mg/lit de GA3

5.7.1.4. Unidades Experimentales:

Para el caso de las puntas meristemáticas la unidad experimental consistió en un meristemo o punta meristemática cultivada en un tubo de ensayo de 50 ml. agregando 15 ml de medio al tubo, con 10 repeticiones para el primer ensayo, 15 repeticiones para el segundo, y 5 repeticiones para el tercero. El número de repeticiones utilizado para cada ensayo en cada tratamiento estuvo en función del número de tratamientos y la disponibilidad de material vegetal.

5.1.7.5 Variables Respuesta:

- a. Número y porcentaje de meristemas no oxidados sin formación de brote
- b. Número y porcentaje de meristemas que formaron brotes o callos.
- c. Número de brotes por meristemo.
- d. Tamaño del brote o callo en cm. a las 10 semanas.
- e. Color y consistencia del callo o brote.

5.7.2. Hojas:

5.7.2.1. Respuesta de los explantes de hoja a la aplicación de ácido naftalenacético (ANA) y bencilaminopurina (BAP) en diferentes concentraciones:

Para determinar la respuesta de las hojas a la organogénesis directa se evaluaron hojas jóvenes en crecimiento entre 2 y 4 cm de largo con tres diferentes niveles de BAP (1, 3 y 5 mg/l), alternados con tres diferentes niveles de ANA (2.5, 5 Y 7 mg/l) en medio basal MS (ver cuadro 6).

5.7.2.2. Respuesta de explantes de hoja en medios líquidos de inducción con diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y bencilaminopurina (BAP).

En el segundo ensayo se evaluó la respuesta de los explantes en un medio líquido de iniciación MS suplementados con BAP y ANA en dos diferentes concentraciones y trasladados a medios sólidos MS de desarrollo sin hormonas (Ver cuadro 7).

Cuadro 6: Tratamientos hormonales utilizados para el estudio de la respuesta de los explante de hoja a la aplicación de ANA y BAP en diferentes concentraciones.

1.	----	----
2.	ANA 2.50	----
3.	ANA 5.00	----
4.	ANA 7.00	----
5.	ANA 2.50	BAP 1.00
6.	ANA 5.00	BAP 1.00
7.	ANA 7.00	BAP 1.00
8.	ANA 2.50	BAP 3.00
9.	ANA 5.00	BAP 3.00
10.	ANA 7.00	BAP 3.00
11.	ANA 2.50	BAP 5.00
12.	ANA 5.00	BAP 5.00
13.	ANA 7.00	BAP 5.00
14.	----	BAP 1.00
15.	----	BAP 3.00
16.	----	BAP 5.00

Cuadro 7: Tratamientos utilizados para evaluar la respuesta de las hojas en medios líquidos de inducción con diferentes concentraciones de ANA y BAP .



- 1 2.5 mg/lit de ANA
- 2 05 mg/lit de ANA.
- 3 2.5 mg/lit de ANA + 1 mg/lit de BAP
- 4 05 mg/lit de ANA + 1 mg/lit de BAP
- 5 2.5 mg/lit de ANA + 5 mg /lit de BAP
- 6 5 mg /lit de ANA + 5 mg/lit de BAP
- 7 1 mg /lit de BAP
- 8 05 mg/lit de BAP
- 9 Testigo

5.7.2.3. Respuesta de explantes de hoja a la suplementación de ácido naftalenacético (ANA) y bencilaminopurina (BAP) en diferentes concentraciones, reduciendo la concentración de los desinfectantes y aumentando la concentración de ácido cítrico y el número de lavados:

Debido a la coloración que el agua presentaba durante los lavados en los estudios anteriores, se trató de determinar si la no respuesta del explante estaba ligada a la retención del desinfectante en la pubescencia de las hojas, por lo que se le aplicaron entre seis y siete lavados hasta que se observó que el agua era incolora. A su vez se utilizaron los brotes recién emergidos después de la estación de reposo y se utilizó solamente 30 segundos en alcohol y 15 minutos en hipoclorito de sodio al 0.8%, para finalmente colocarlas en una solución de antioxidante que contenía ácido cítrico a 200 mg/l.

Cuadro 8: Tratamientos evaluados durante el tercer estudio para la respuesta de explantes de hoja a distintas concentraciones de ANA y BAP.

|--|--|

- 1 1 mg/lit de BAP
- 2 5 mg/lit de BAP
- 3 1 mg/lit de BAP + 0.5 mg/lit de ANA
- 4 1 mg/lit de BAP + 2 mg/lit de ANA
- 5 1 mg/lit de BAP + 5 mg/lit de ANA
- 6 5 mg/lit de BAP + 0.5 mg/lit de ANA
- 7 5 mg/lit de BAP + 2 mg/lit de ANA
- 8 5 mg/lit de BAP + 5 mg/lit de ANA
- 9 0.5 mg/lit de ANA
- 10 2 mg/lit de ANA
- 11 5 mg/lit de ANA
- 12 Testigo

5.7.2.4. Unidad Experimental:

En el caso de los explantes de hoja la unidad experimental consistió en 4 explantes de un centímetro cuadrado los cuales fueron sembrados en un frascos de vidrio de 100 ml a los cuales se les agregó 20 ml de medio.

5.7.2.5. Variables Respuesta:

Las variables respuesta tomadas fueron las siguientes:

- a. Número y porcentaje de explantes no oxidados.

- b. Número de callos o brotes producidos por explante.
- c. Tipo de organogénesis.
- d. Tamaño de las brotes o callos inducidos a las 10 semanas.

5.8. TOMA DE DATOS:

Tanto para el caso de los meristemos como de las hojas se consideró la presencia o no de oxidación dos semanas después de la siembra, y el resto de variables se midió después de la décima semana.

5.9. ANALISIS DE LA INFORMACION:

Dada las características descriptivas del trabajo, que no pretendía entre sus objetivos evaluar ni establecer diferencias entre los distintos tratamientos estudiados, sino solo conocer la respuesta de los distintos tipos de explantes a los distintos medios de cultivo utilizados para determinar cuales podrían ser promisorios para el desarrollo de la propagación *in vitro* del zapote, se planteó un análisis descriptivo en base a frecuencias, medias y porcentajes de las variables respuesta. Dada la amplia gama de variables respuesta, el número de factores y niveles estudiados, el bajo número de repeticiones por tratamiento que mostraron respuesta y las características particulares que estos estudios tienen en cuanto a su respuesta altamente irregular como se puede apreciar en los resultados no fue factible aplicar estadísticos paramétricos.

Se desechó la aplicación de pruebas no paramétricas debido a que en los tratamientos que manifestaron la respuesta deseada, es decir elongaron y desarrollaron, las variables respuesta presentaban consistencia, es decir todos los brotes producidos fueron verdes y vitrificados. Ver cuadro 12.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Meristemos

6.1.1. Respuesta de los meristemos a los medios basales Murashigue y Skoog (MS) y Woody Plant Medium (WPM) de cultivo con bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (GA3) en diferentes concentraciones:

De los 24 tratamientos que fueron evaluados durante el primer ensayo únicamente 6 manifestaron algún tipo de respuesta (ver cuadro 9). La respuesta observada consistió en una ligera elongación del meristemo y la apertura de los primordios foliares que habían quedado remanentes, sin embargo; al cabo de 4 semanas de realizada la siembra los meristemos empezaron a oxidarse y murieron entre la quinta y sexta semana de sembrados después de realizados 3 subcultivos. Se pudo observar al realizar los subcultivos y extraer el meristemo, que la parte del meristemo donde se realizó el corte se encontraba necrosada y oscura lo que podría estar asociado a la acumulación de sustancias sobre la zona pese a la aplicación del carbón. Por otro lado la escasa respuesta de elongación del meristemo podría estar asociada a que el tamaño del meristemos limitaba el potencial de desarrollo, ya que como indican las referencias bibliográficas el tamaño del explante incide en la capacidad de desarrollo del mismo (ver inciso 3.1.10.1).

En los tratamientos en los que se adicionó GA3 en concentraciones de 1 y 0.5 mg/lit más BAP en concentraciones de 2 y 5 mg/lit se manifestó la respuesta inicial, por lo que se puede inferir que actuando conjuntamente poseen efecto sobre la elongación inicial del meristemo como ocurre en especies de los generos *Rhododendron* y *Rosa*, (19) (4).

Contrario a lo sucedido con embriones de zapote (*Pouteria sapota*, L. Cronquist) la aplicación de BAP solo no manifestó el tipo de respuesta esperada en ninguno de los niveles evaluados para el desarrollo de embriones maduros sobre medios de cultivo *in vitro* (5)

La mayor respuesta en los medios basales se observó en el medio MS con un 7% de respuesta en la elongación y desarrollo del meristemo contra solo el 2% del medio WPM. (ver cuadro 9)

6.1.2. Respuesta de los meristemos y las puntas meristemáticas a un medio líquido de inducción Murashigue y Skoog (MS) con dos diferentes concentraciones de ácido giberélico (GA3) y un medio de desarrollo con ácido naftalenacético (ANA), benciaminopurina (BAP) y ácido giberélico en similar concentración :

Existe una mayor respuesta del explante cuando se utiliza la punta meristemática que incluye meristemo y 5 mm de tallo, que cuando sólo se utiliza el meristemo el cual se oxida rápidamente. Un total de 23 explantes equivalentes al 67% del total en los que se utilizó la punta apical permanecieron vivos y sin oxidarse contra sólo 4 equivalentes al 13% en los que se utilizó el meristemo después de doce días de estar en el medio líquido de inducción (ver cuadro 10 y figura 1). En tanto un 30% de las puntas meristemáticas trasladadas al medio de desarrollo produjeron callos mientras que ninguno para el caso de los meristemos, ello refleja que el tamaño del explante influye en el potencial de respuesta del mismo. Ver cuadro 11 y figura 2

Se pudo observar también que tanto los meristemos como las puntas meristemáticas iniciadas sobre los medios líquidos de inducción tenían una menor acumulación de sustancias sobre la región del corte por lo que presentaban una mejor apariencia en su estado general, lo que indica que dichas sustancias son lavadas de la zona por efecto de la agitación del medio y el carbón.

En cuanto a la regulación hormonal los resultados demostraron que concentraciones de 0.5 mg/lit de GA3 en medios líquidos de inducción promovieron tanto para el caso de los meristemos, como para el de las puntas meristemáticas una elongación inicial, contrario a lo sucedido cuando se aplicó 0.1mg/lit de GA3 donde no se observó ningún tipo de respuesta.

En el medio de desarrollo concentraciones iguales de ANA, BAP y GA3 de 0.5 mg/lit promovieron el encallamiento de las puntas meristemáticas . Las puntas iniciadas sobre medios de inducción que contenían 0.5 mg/lit de GA3 fueron de un color crema, una consistencia friable, un largo de 1.72 cm. sin presencia de puntos de crecimiento, obteniéndose dicha respuesta en un 45% de los explantes trasladados al medio de desarrollo. Las puntas iniciadas sobre medios de inducción con 0.1 mg/lit de GA3 mostraron un menor tamaño promedio (1.1 cm) y un menor porcentaje de respuesta (17%) que las iniciadas con 0.5 mg/lit de GA3. (ver figuras 1 y 2 y cuadros 10 y 11)

Cuadro 10: Estudio de la respuesta de los meristemas y las puntas meristemáticas a medios líquidos de inducción MS, con dos concentraciones de GA3.

		0,5 mg GA3	12	80	3	20	Elongacion	2	13	1 Im.	verde
1	Meristemo										
2	Meristemo	0,1 mg GA3	14	93	1	7	Ninguna	0	0	--	--
	TOTAL		26	87	4	13	RESPUESTA	2	7	--	--
3	Punta	0,5 mg GA3	4	27	11	73	Elongacion	9	90	13	verde
4	Punta	0,1 mg GA3	3	26	12	80	Ninguna	0	0	--	--
	TOTAL		7	23	23	67	RESPUESTA	9	90	13	verde

M= Meristemos
PM= Puntas

1= 0.5 mg/lt de GA3
2= 0.1 mg/lt de GA3

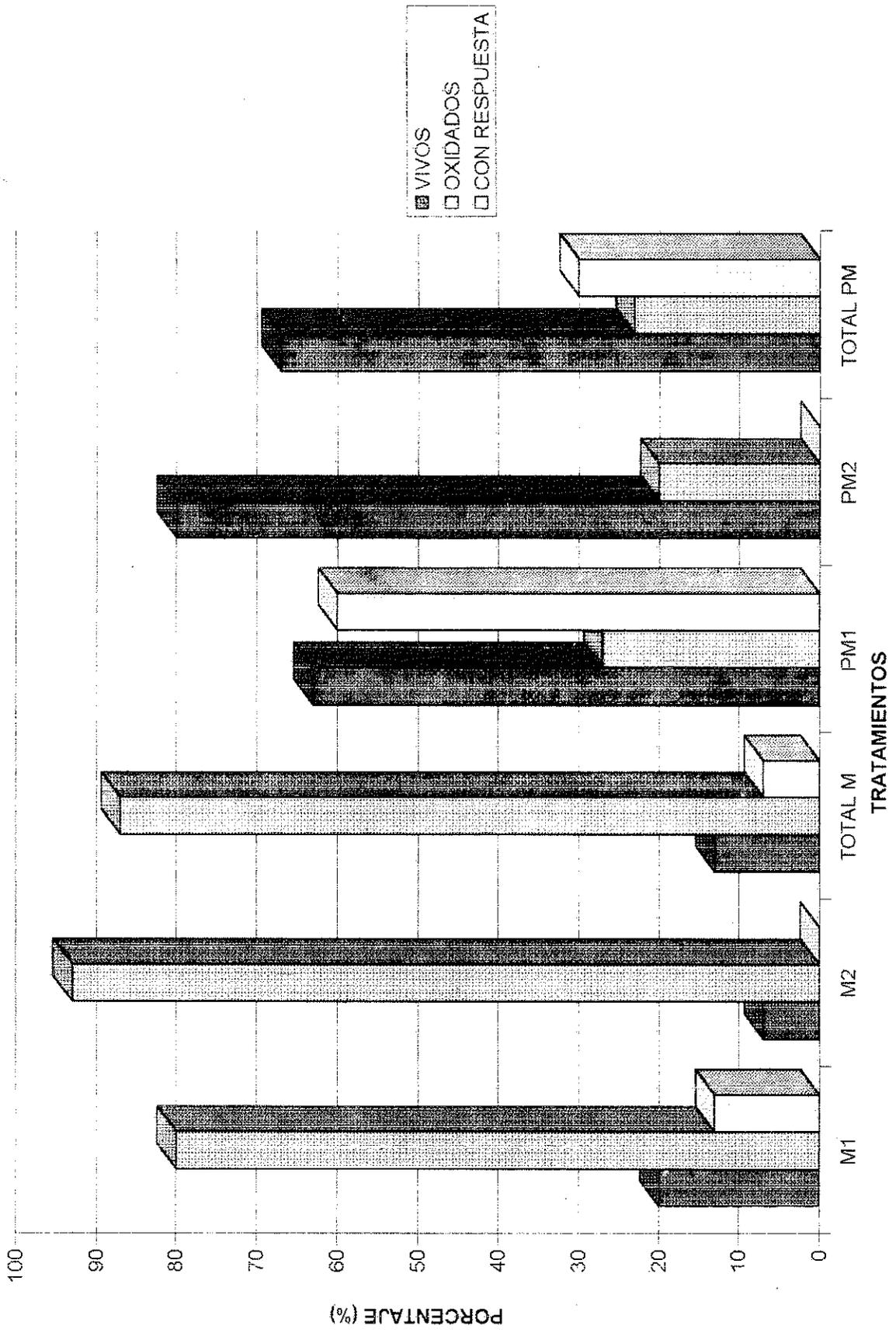


FIGURA 1 : Respuesta de las puntas meristemáticas y los meristemos a medios líquidos de inducción con diferentes

Cuadro 11: Respuesta de los meristemos y las puntas meristemáticas a medios de desarrollo MS, suplementados con ANA, BAP y GA3 en similares concentraciones.

EFFECTO DE LAS PUNTERAS MERISTEMÁTICAS Y DE LOS MERISTEMOS EN LA RESPUESTA A LOS MEDIOS DE DESARROLLO MS SUPLEMENTADOS CON ANA, BAP Y GA3

Nº	Meristemo	A	B	100	0	0	0	Ninguna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	Meristemo	1 A	3	100	0	0	0	Ninguna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	Meristemo	1 B	1	100	0	0	0	Ninguna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	TOTAL		4	100	0	0	0	RESPUESTA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	Punta	1 A	4	37	7	63		Callo	5	15	17		Crema						1 viable	
4	Punta	1 B	7	58	1	12		Callo	2	17	11		Crema							1 viable
	TOTAL		11	48	12	52		RESPUESTA	7	30			Crema							

Referencia:

- 1 - 0.5 mg/l de Ana + 0.5 mg/l de BAP + 0.5 mg/l de GA3
- A: Iniciado en medio líquido de inducción con 0.5 mg/l de GA3
- B: Iniciado en medio líquido de inducción con 0.1 mg/l de GA3

NOTA: El número de explantes evaluados en el presente cuadro por tratamiento estuvo en función de los explantes que sobrevivieron a la fase de inducción (ver cuadro 10)

M= MERISTEMO
 P= PUNTA

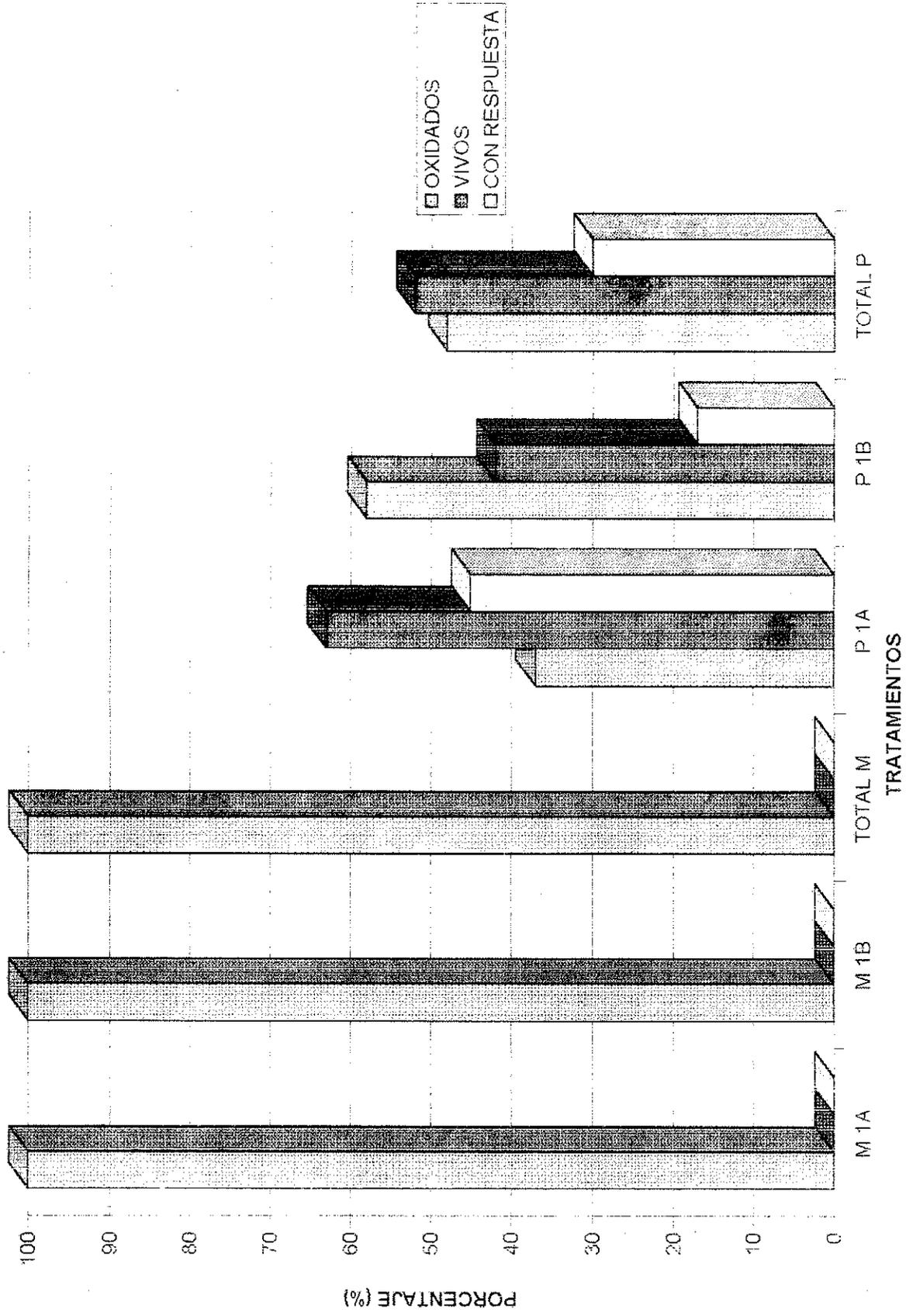


Figura 2: Respuesta de los meristemos y las puntas meristemáticas en medios de desarrollo con iguales concentraciones de ANA, BAP y GA3 (ver referencia cuadro 11)

6.1.3. Respuesta de las puntas meristemáticas a dos medios basales de iniciación con cuatro niveles de ácido giberélico y dos medios basales de desarrollo con tres tipos de reguladores del crecimiento en diferentes concentraciones:

Partiendo de lo más general en cuanto a lo que es el medio basal de inducción y desarrollo se observó que el porcentaje de respuesta de los explantes fue mayor sobre el medio basal MS. De acuerdo a lo observado, en un total de 27 explantes equivalentes al 27% del total se observó algún tipo de respuesta, sobre el medio basal MS, contra sólo 12 explantes equivalentes a un 12% del total que mostraron algún tipo de respuesta en el medio WPM. Cabe resaltar que un total del 54% de los explantes cultivados en el medio MS permanecieron vivos después de la décima semana de realizada la siembra, en comparación del 19% que fueron cultivados en el medio WPM. (Ver figura 3 y cuadro 12)

En cuanto al medio de iniciación se observó que fueron los medios suplementados con 1 mg/lit de GA3 los que presentan mayor respuesta tanto para el medio MS como para el medio WPM. Un total de 11 explantes equivalentes a un 44% del total de explantes sembrados para el medio MS con 1 mg/lit de GA3 exhibieron algún tipo de respuesta; mientras que un total de 5 explantes equivalentes a un 20% lo hicieron para el medio WPM con el mismo tratamiento. Los tratamientos también reflejan que a medida que aumenta la concentración de GA3 sobre el medio de inducción aumenta proporcionalmente la respuesta del mismo independientemente de que medio basal se utilice. (ver figura 4 y cuadro 12)

Finalmente en cuanto a los medios de desarrollo se observó que el tratamiento con 2 mg/lit de BAP más 0.5 mg/lit de ANA fue en el que se observó un mayor número de respuesta en cuanto a la elongación y desarrollo del meristemo con 13 explantes para un porcentaje del 35.5% del total de explantes evaluados por tratamiento, seguido del tratamiento con 1 mg/lit de BAP más 0.5 mg/lit de ANA más 0.5 mg/lit de GA3 con 9 explantes para un 22.5% y del tratamiento con 1mg/lit de BAP más 0.5 mg/lit de ANA con 8 explantes, para un 20%. (ver figura 5 y cuadro 12)

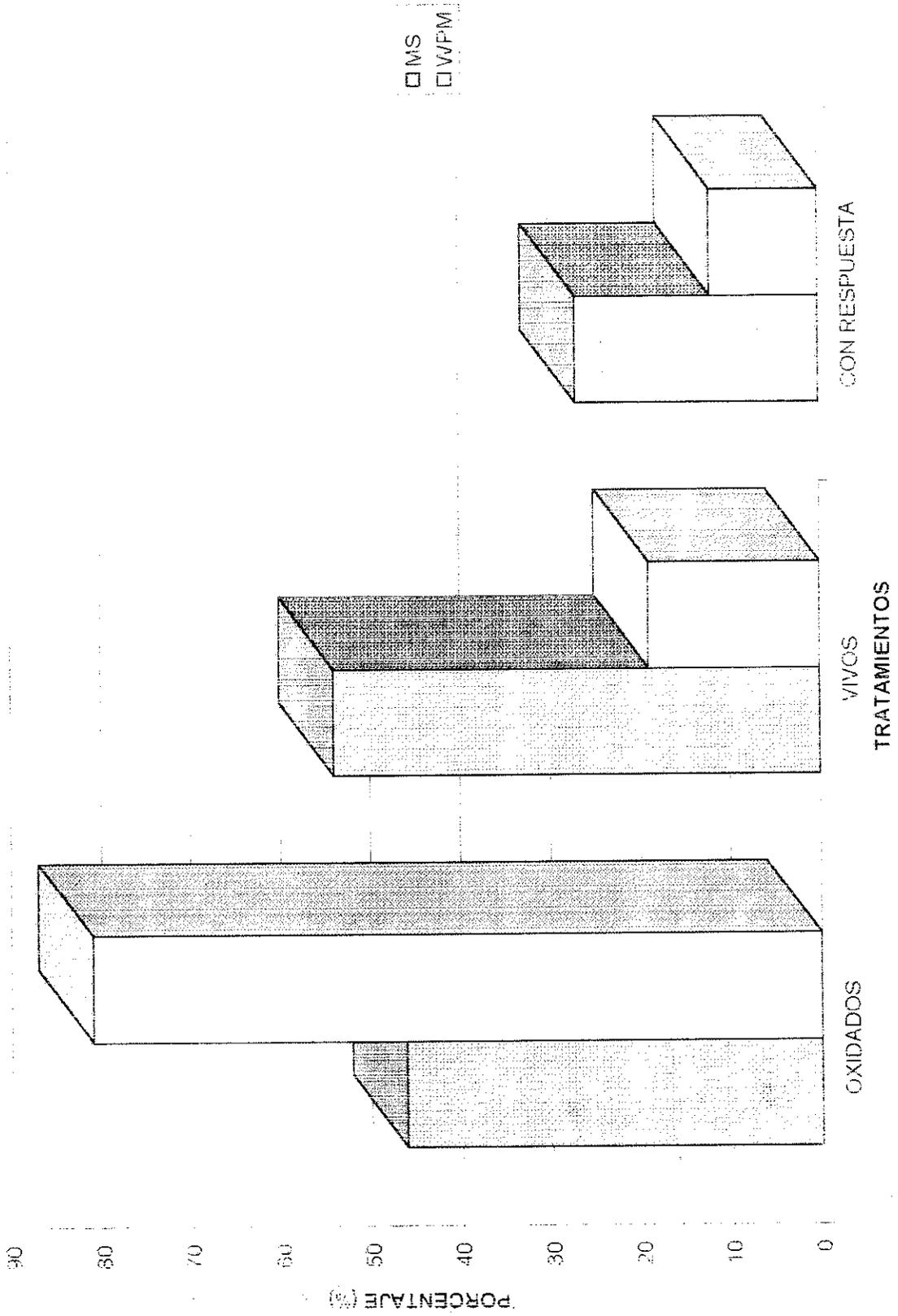


Figura 3: Respuesta de las puntas meristemáticas a diferentes medios basales

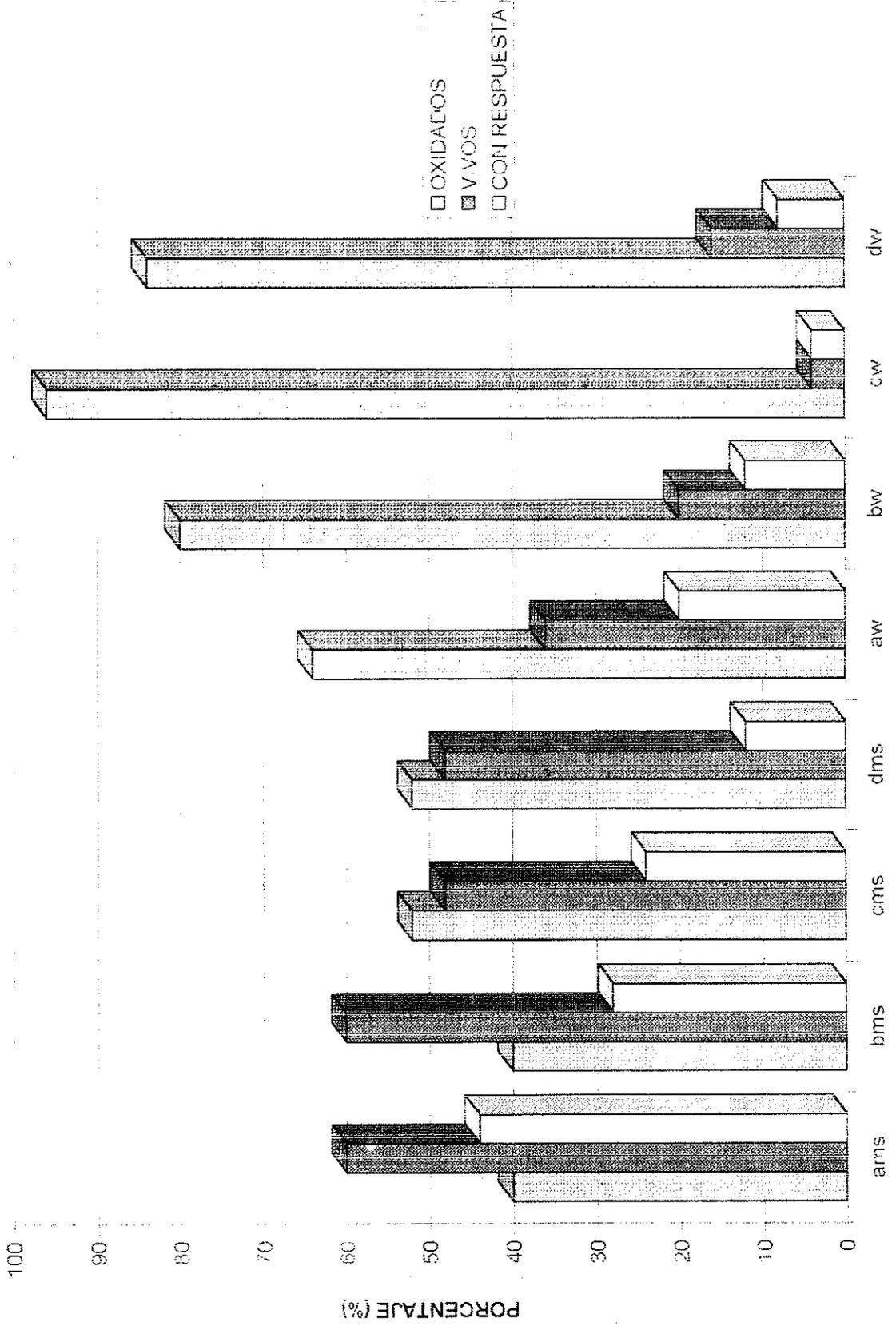


Figura 4: Respuesta de las puntas meristemáticas a medios de inducción suplementados con 4 niveles de GA3. (ver referencia cuadro 12)

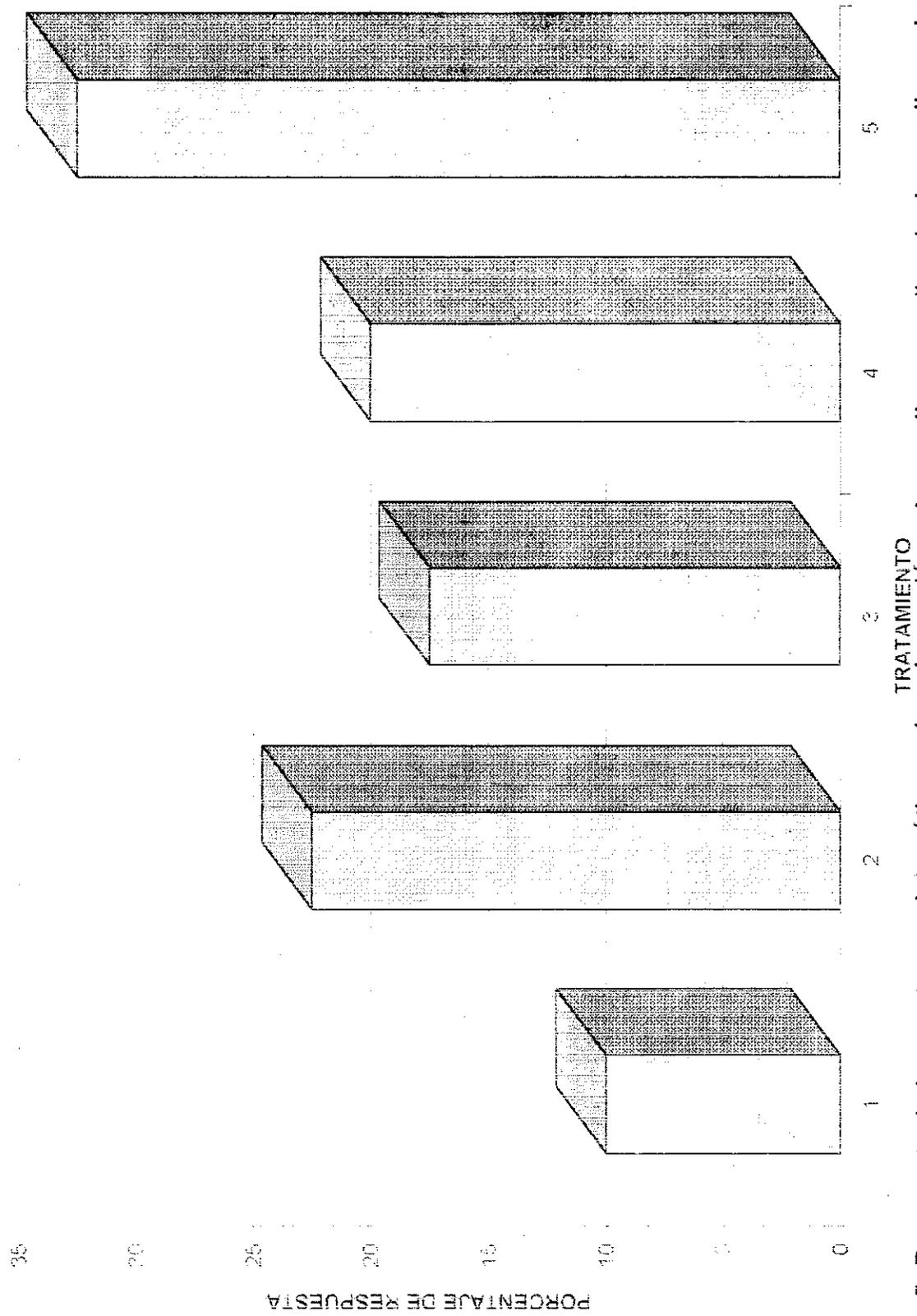


Figura 5: Respuesta de las puntas meristemáticas a la enlongación y desarrollo en medios de desarrollo suplementado con ANA, BAP y GA3 en diferentes concentraciones. (ver referencia cuadro 12)

a. Tamaño y condición de los brotes:

Un total de 8 tratamientos produjeron brotes, ya sea solos o acompañados de callo, de estos tratamientos fue el tratamiento con 1 mg/l de GA3 en el medio de inducción y 2 mg de BAP más 0.5 mg/l de ANA en el medio de desarrollo sobre medio basal MS en el que mejor resultados se obtuvieron, y que se produjo formación de brotes en un 60% de los explantes sin presencia de callo, sin embargo, como en todos los casos los brotes fueron con hojas muy succulentas y nasalizadas de color verde (vitrificadas). Ver cuadro 13.

Los tratamientos con 1 mg/l de GA3 en el medio de inducción y 2 mg de BAP más 0.5 mg/l de ANA en el medio de desarrollo, 0.5 mg de GA3 en el medio de inducción más 2 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de ANA en medio de desarrollo en el medio basal MS produjeron también brotes sin callo, como también lo hicieron los tratamientos que contenían 1 mg/l de GA3 en medio de inducción más 2 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de ANA en el medio de desarrollo, 0.8 mg/l de GA3 y 1 mg/l de BAP más 0.5 mg/l de ANA más 0.5 mg/l de GA3 en medio de desarrollo en el medio basal WPM.

Los tratamientos con 1 mg/l de GA3 en medio de inducción y con 1 y 2 mg/l de BAP más 0.5 de ANA más 0.5 mg/l de GA3 en el medio de desarrollo en medio basal MS, y el tratamiento con 0.8 mg/l de GA3 en medio de inducción más 2 mg de BAP y 0.5 mg/l de ANA en medio de desarrollo sobre medio basal WPM mostraron brotes con callo, cuyo color y consistencia fue variable atendiendo al tipo de tratamiento predominando el color verde y de consistencia semicompacta. Ver figura 6 y cuadro 13.

Observando la figura 6 puede apreciarse que existió un mayor porcentaje de respuesta a la formación de brotes en el medio MS que en el medio WPM. La respuesta de los explantes a la formación de brotes sobre medio basal MS estuvo en valores comprendidos entre el 40 y 60%, en comparación con el medio WPM en el que la mayoría de los tratamientos produjeron brotes en un 20% de los explantes evaluados.

En cuanto al tamaño de los brotes, debido a la condición vitrificada de los mismos se obtuvo un escasa elongación y desarrollo empezando a emerger entre la cuarta y la quinta semana de realizada la siembra.

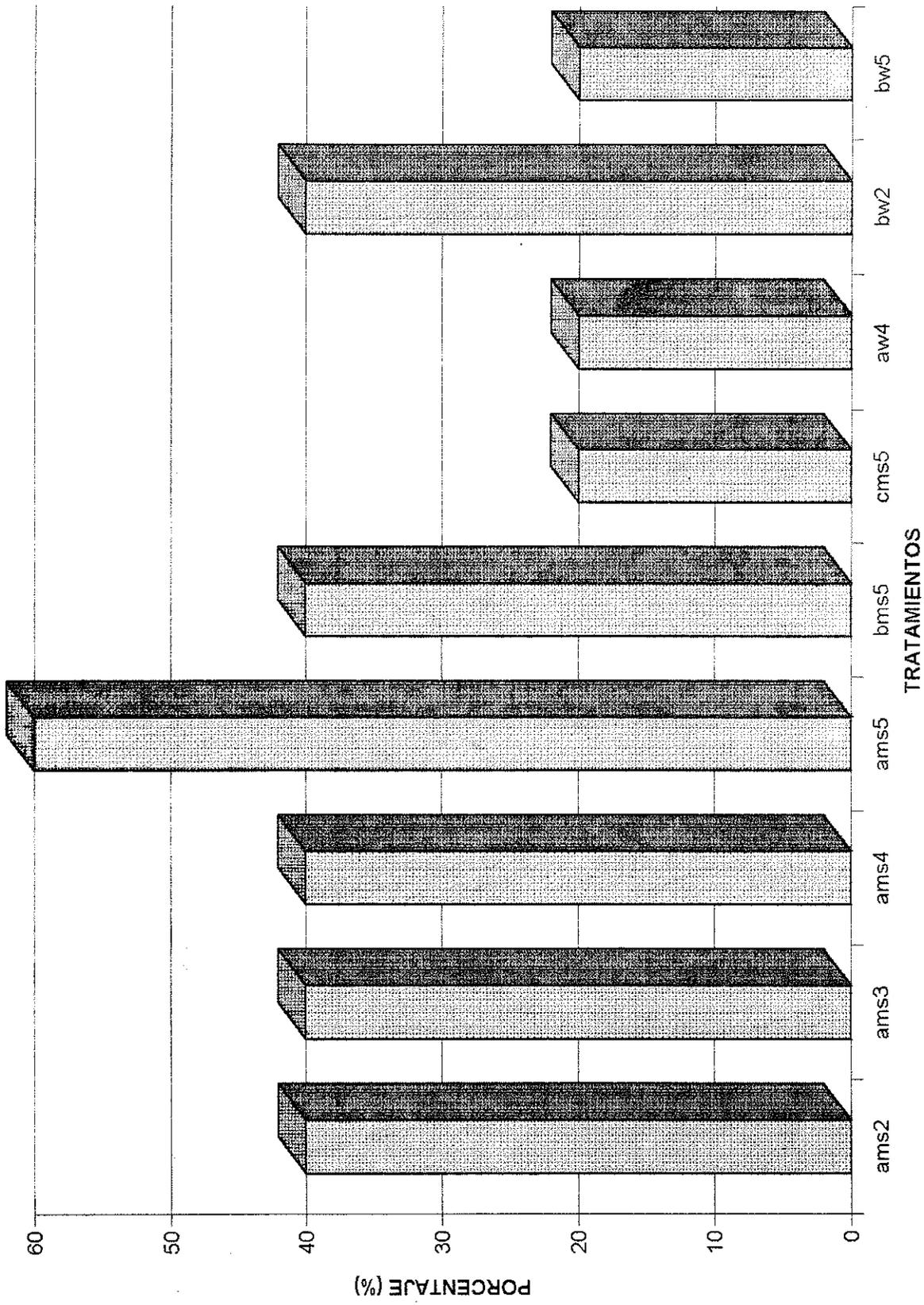


Figura 6: Respuesta de los tratamientos a la formación de brotes en base a porcentaje. (ver referencia cuadro 13)

Los brotes más grandes se registraron en medios basales MS que contenían 1mg/lit de GA3 en el medio de inducción y 1 y 2 mg lit de BAP más 0.5 mg de ANA en el medio de desarrollo con 1.6 cm y 1.4 cm de largo respectivamente, y con 1mg/lit de GA3 en medio de inducción más 1 mg de BAP y 0.5 mg/lit de ANA en el medio de desarrollo, en el medio basal WPM con una elongación de 1.8cm.

La menor elongación y desarrollo de los meristemas se obtuvo en medio basal MS que contenían 0.8 mg/lit de GA3 en el medio de inducción y 2 mg de BAP más 0.5 mg lit de ANA en el medio de desarrollo y 1 mg/lit de GA3 en el medio de inducción y 1 mg lit de BAP más 0.5 mg/lit de ANA más 0.5 mg/lit de GA3 en el medio de desarrollo, con 0.8 cm de longitud.

En el medio basal MS con 1mg/lit de GA3 en el medio de inducción y 2mg de BAP más 0.5 mg de ANA en el medio de desarrollo se obtuvieron brotes de 2 cm de longitud aunque en su promedio se encuentren en menor tamaño que el medio basal WPM que contenía 1 mg/lit de GA3 en medio de inducción y 1 mg/lit de BAP más 0.5 mg/lit de ANA en el medio de desarrollo donde sólo se obtuvo respuesta en un brote .

En general la ausencia de GA3 en los medios de desarrollo favorece la formación de brotes en proporciones de auxina citocinina de 4:1 y 2:1 independientemente del medio basal . Ver figura 7 y cuadro 13.

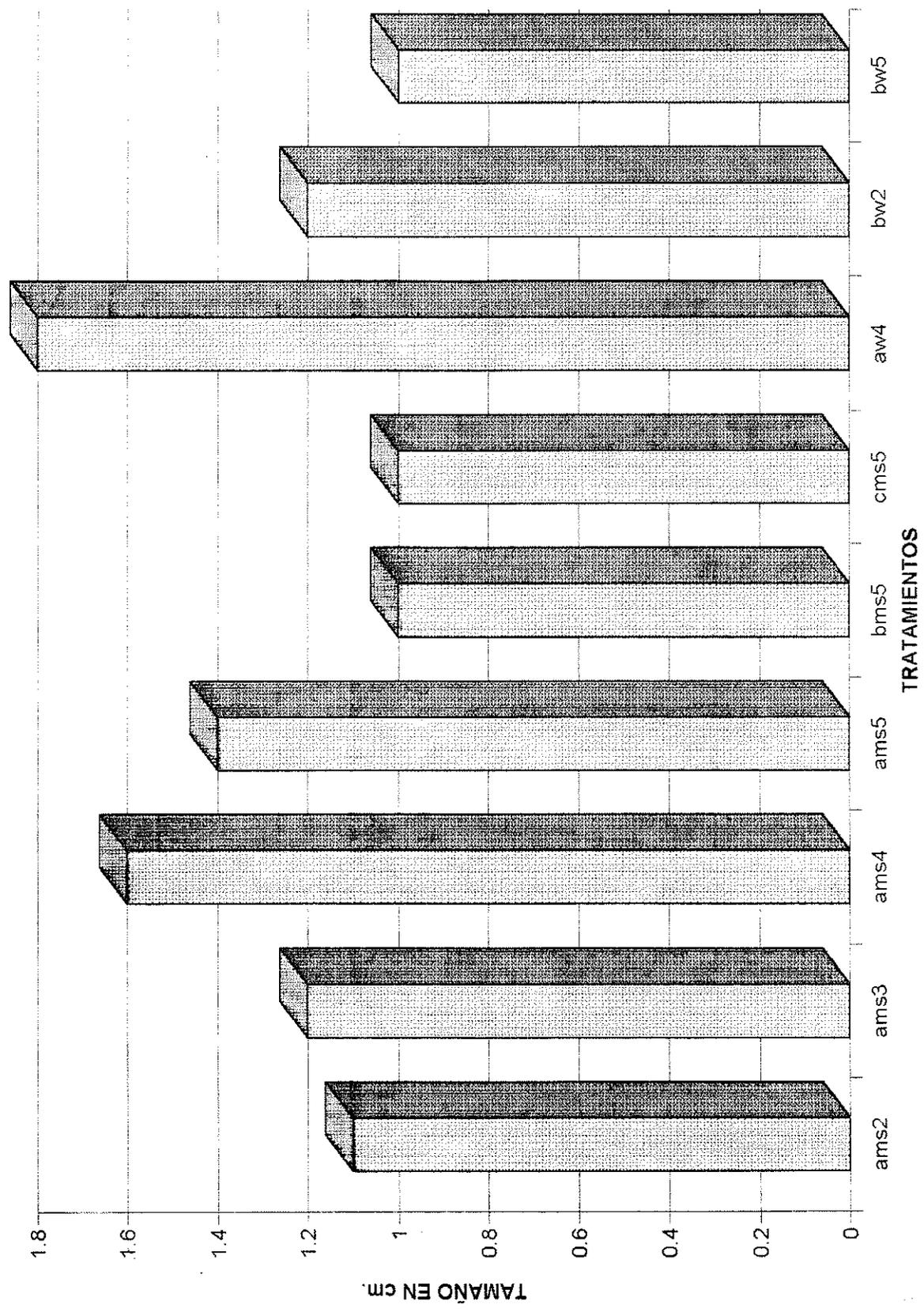


Figura 7: Tamaño promedio de los brotes producidos en base al tratamiento (ver referencia en cuadro 13)

b. Tamaño y consistencia del callo:

Los callos se desarrollaron entre la tercera y la cuarta semana de realizada la siembra. Los mejores tratamientos en cuanto al porcentaje de meristemas que formaron callo de una consistencia semicompacta, color verde y puntos verde oscuros con crecimiento (embroides), se registraron sobre los tratamientos en medio basal MS que contenían 0.8 mg/lit de GA3 en medio de inducción y 1 mg/lit de BAP más 0.5 mg/lit de ANA más 0.5 mg/lit de GA3 en el medio de desarrollo, obteniéndose dicha respuesta en un 60% de los mismos. La adición de 0.8 mg/lit de GA3 en medio de inducción y 2 mg/lit de BAP más 0.5 mg/lit de ANA más 0.5 mg/lit de GA3 en medio de desarrollo indujo a la formación de callo en un 40%, similar porcentaje de respuesta se obtuvo al aplicar 0.5 mg/lit de GA3 en medio de inducción y 2 mg/lit de BAP más 0.5 mg/lit de ANA más 0.5 mg/lit de GA3 en el medio de desarrollo. De la misma manera en cuanto al tamaño del callo se refiere los mejores resultados se observaron para los tratamientos mencionados con largos de 1.8, 2 y 2.4 cm respectivamente. Ver Cuadro 14 y figuras 8 y 9

Como se puede apreciar en las figuras 8 y 9 existe una mayor respuesta del explante en cuanto al porcentaje de brotes que forman callo y el tamaño de los mismos en el medio basal MS que sobre el medio basal WPM. El tratamiento que contenía 1 mg/lit de GA3 en el medio de inducción y 2 mg/lit de BAP más 0.5 mg/lit de ANA en el medio basal de desarrollo produjo callo en un 60% de los explantes tratados, sin embargo; el tamaño de los mismos fue de 0.8 cm en promedio, sobre el medio WPM.

Los tratamientos con 1 mg/lit de GA3 en el medio de inducción y sin hormonas en el medio de desarrollo para ambos medios basales, produjeron callos pequeños de consistencia friable y de color crema, lo que indica que la suplementación de BAP y ANA puede ser necesaria para un mejor tamaño, color y consistencia de los callos producidos.

En ambos medios la suplementación de 0.5 mg de GA3 en medios de desarrollo promueve la formación de callo como se observa en los tratamientos con 1 mg de BAP más 0.5 mg de ANA más 0.5 mg de GA3; y 2 mg de BAP más 0.5 mg de ANA más 0.5 mg de GA3. Ver cuadro 14.

Cuadro 14: Cuadro resumen del tamaño y condición de los callos producidos por puntas meristemáticas de zapote utilizando dos diferentes medios basales de cultivo con tres diferentes tipos de reguladores del crecimiento en diferentes concentraciones :

Medio de cultivo	Concentración de reguladores de crecimiento	Medio de cultivo	Concentración de reguladores de crecimiento	Medio de cultivo	Concentración de reguladores de crecimiento	Medio de cultivo	Concentración de reguladores de crecimiento
1 mg de GA3 (MS)	Sin hormonas (MS)	ams1	40	0.8	Fríable		
1 mg de GA3 (MS)	1 mg de BAP + 0.5 mg de ANA + 0.5 mg de GA3 (MS)	bms2	60	1.8	Semicompacto*		
0.8 mg de GA3 (MS)	2 mg de BAP + 0.5 mg de ANA + 0.5 mg de GA3 (MS)	bms3	40	2	Semicompacto*		
0.5 mg de GA3 (MS)	1 mg de BAP + 0.5 mg de ANA + 0.5 mg de GA3 (MS)	cms2	40	0.8	Fríable*		
0.5 mg de GA3 (MS)	2 mg de BAP + 0.5 mg de ANA + 0.5 mg de GA3 (MS)	cms3	40	2.4	Semicompacto*		
1 mg de GA3 (WPM)	Sin hormonas (WPM)	aw1	20	0.8	Fríable		
1 mg de GA3 (WPM)	2 mg de BAP + 0.5 mg de ANA (WPM)	aw5	60	0.9	Semicompacto*		
0.5 mg de GA3 (WPM)	2 mg de BAP + 0.5 mg de ANA (WPM)	cw5	20	0.9	Fríable*		
0.2 mg de GA3 (WPM)	Sin hormonas (WPM)	dw1	20	0.8	Fríable		
0.2 mg de GA3 (WPM)	1 mg de BAP + 0.5 mg de ANA (WPM)	dw4	20	0.8	Fríable		

() Medio basal.

* Con puntos de crecimiento.

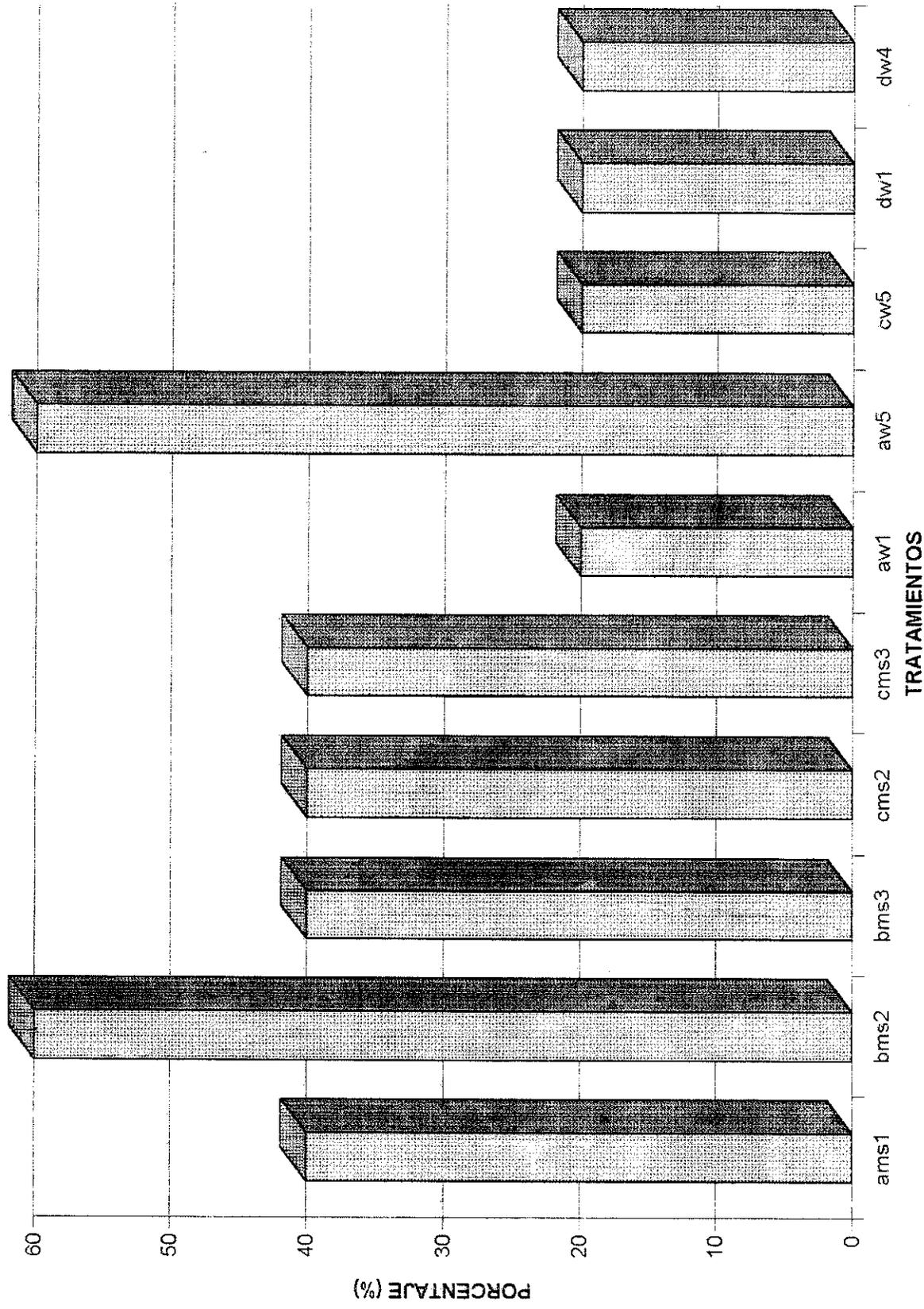


Figura 8: Respuesta de los tratamientos a la formación de callo en base a porcentaje (ver referencia cuadro 14)

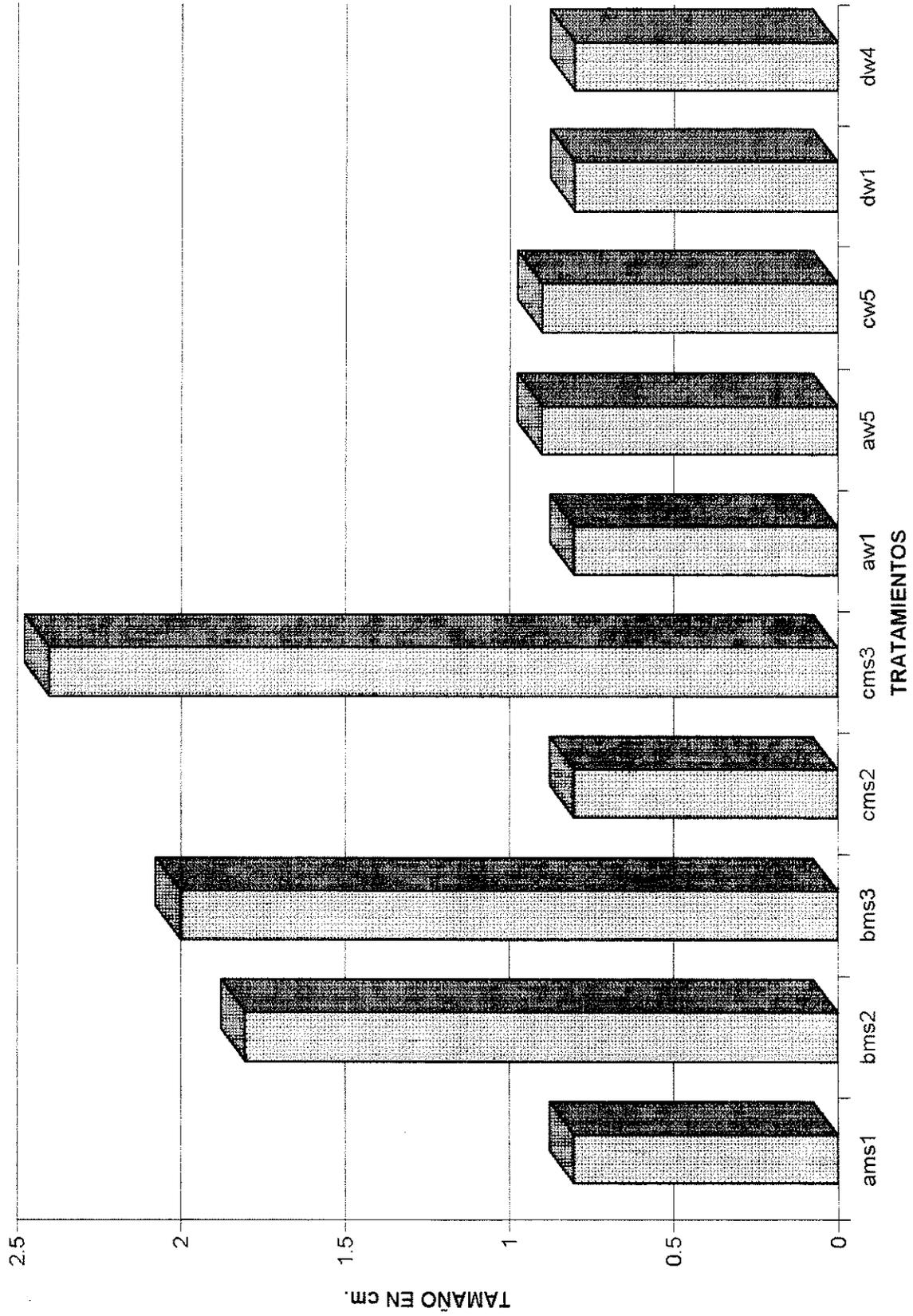


Figura 9: Tamaño promedio de los callos producidos por los distintos tratamientos. (ver referencia cuadro 14)

6.2. HOJAS:

6.2.1. Respuesta de los explantes de hoja a la aplicación de ácido naftalenacético (ANA) y bencilaminopurina (BAP) en diferentes concentraciones

Como se puede apreciar en el cuadro 15 únicamente 3 de los 16 tratamientos evaluados manifestaron algún tipo de respuesta. La respuesta observada consistió en hinchamiento y arrugado del limbo similar al que se produce antes del encallamiento normal del explante, sin embargo pese a que las hojas permanecieron verdes por más de 7 semanas no se produjo ningún tipo de respuesta ulterior después de tres subcultivos. Las hojas con respuesta se oxidaron entre la octava y décima semana después de la siembra. Ver cuadro 15

Los explantes que mostraron el tipo de respuesta anterior fueron los tratamientos que contenían 2 mg/lit de ANA, 5 mg/lit de ANA y 1 mg/lit de BAP más 5 mg /lit de ANA.

Los tratamientos que sólo contenían BAP no manifestaron algún tipo de respuesta inicial al igual que los tratamientos sin reguladores del crecimiento.

Se pudo apreciar también que concentraciones de ANA de 7 mg/lit producían una rápida oxidación del explante.

6.2.2. Respuesta de explantes de hoja a medios líquidos de inducción con diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y bencil aminopurina (BAP):

No existió ningún tipo de respuesta para los tratamientos evaluados. Las hojas no mostraron ningún tipo de respuesta tanto en el medio de inducción que estaba suplementado con hormonas, como en el medio de desarrollo, oxidándose entre la tercera y cuarta semana después de la siembra. Ver cuadro 16.

Cuadro 15: Estudio de la respuesta de explantes de hoja a diferentes concentraciones de ANA Y BAP.

1	2.5 mg de ANA	18	90	2	20	Limbo hinchado y arrugado	2	10	
2	5 mg de ANA	17	85	3	15	Limbo hinchado y arrugado	3	15	
3	7 mg de ANA	20	100	0	0	Ninguna	0	0	
4	1mg de BAP + 2.5 mg de ANA	20	100	0	0	Ninguna	0	0	
5	1 mg de BAP y 5 mg de ANA	19	95	1	5	Limbo hinchado y arrugado	1	5	
6	1 mg de BAP y 7 mg de ANA	20	100	0	0	Ninguna	0	0	
7	3 mg de BAP y 2.5 mg de ANA	19	95	1	5	Ninguna	0	0	
8	3 mg de BAP y 5 mg de ANA	20	100	0	0	Ninguna	0	0	
9	3 mg de BAP y 7 mg de ANA	20	100	0	0	Ninguna	0	0	
10	5 mg de BAP y 2.5 mg de ANA	20	100	0	0	Ninguna	0	0	
11	5 mg de BAP Y 5 mg de ANA	20	100	0	0	Ninguna	0	0	
12	5 mg de BAP y 7 mg de ANA	20	100	0	0	Ninguna	0	0	
13	1 mg de BAP	16	80	4	20	Ninguna	0	0	
14	2.5 mg de BAP	18	90	2	10	Ninguna	0	0	
15	5 mg de BAP	20	100	0	0	Ninguna	0	0	
16	Testigo	16	80	4	20	Ninguna	0	0	

Cuadro 16: Estudio de la respuesta de explantes de hoja a medios líquidos de inducción con diferentes concentraciones de ANA y BAP.

Nº	TRATAMIENTO MEDIO	OXIDACION	NO OXIDACION	TOTAL	TIPO DE RESPUESTA	SI	NO	
1	2.5 mg de ANA	3	60	2	40	Ninguna	0	0
2	5 mg de ANA	4	80	1	20	Ninguna	0	0
3	2.5 mg de ANA y 1 mg de BAP	4	80	1	20	Ninguna	0	0
4	5 mg de ANA y 1 mg de BAP	5	100	0	0	Ninguna	0	0
5	2.5 mg de ANA y 2 mg de BAP	4	80	1	20	Ninguna	0	0
6	5 mg de ANA y 2 mg de BAP	5	100	0	0	Ninguna	0	0
7	1 mg de BAP	4	80	1	20	Ninguna	0	0
8	2 mg de BAP	5	100	0	0	Ninguna	0	0
9	Testigo	3	60	2	40	Ninguna	0	0
TOTAL		37	82	8	18	RESPUESTA	0	0

6.2.3. Estudio de la respuesta de explantes de hojas a la suplementación de ácido naftalenacético y bencilaminopurina en diferentes concentraciones.

El aumento del número de lavados a los explantes, la adición de mayor cantidad de antioxidante y la reducción de la concentración del hipoclorito de sodio para la desinfección de 1.06% a 0.8% durante 15 minutos y del alcohol al 70% de dos minutos a 30 segundos, no redujeron la oxidación del explante. Los explantes de hoja se oxidaron entre la octava y décima semana de sembrados luego de una respuesta inicial que como en el caso del primer estudio consistió en un hinchamiento y arrugado del limbo.

Los tratamientos que mostraron el tipo de respuesta indicada fueron: 1 mg/lit de BAP más 0.5 mg/lit de ANA, 5 mg/lit de ANA y 2 mg/lit de ANA. Ver cuadros 15 y 17

Cuadro 17: Estudio de la respuesta de explantes de hojas a la suplementacion de ANA y BAP en diferentes concentraciones.

1	1 mg de BAP	12	60	8	40	Ninguna	0	0
2	5 mg de BAP	18	90	2	10	Ninguna	0	0
3	1 mg de BAP + 0.5 mg de ANA	17	85	3	15	Ninguna	0	0
4	1 mg de BAP + 2 mg de ANA	17	85	3	15	Hinchamiento y arrugado del limbo	2	10
5	1 mg de BAP + 5 mg de ANA	19	95	1	5	Ninguna	0	0
6	5 mg de BAP + 0.5 mg de ANA	20	100	0	0	Ninguna	0	0
7	5 mg de BAP + 2 mg de ANA	20	100	0	0	Ninguna	0	0
8	5 mg de BAP + 5 mg de ANA	20	100	0	0	Ninguna	0	0
9	5 mg de ANA	12	60	8	40	Hinchamiento y arrugado del limbo	6	30
10	2 mg de ANA	18	90	2	10	Hinchamiento y arrugado del limbo	2	10
11	0.5 mg de ANA	20	100	0	0	Ninguna	0	0
12	Testigo	14	70	6	30	Ninguna	0	0
TOTAL		197	86	33	14	RESPUESTA	12	5.2

7. CONCLUSIONES

- 7.1 El tamaño del explante para el caso de los meristemos influye en el potencial de desarrollo del mismo, ya que los resultados mostraron una mayor respuesta de desarrollo sobre la punta apical que incluye el meristemo y unos 5 mm. de tallo, en comparación con el cultivo de sólo el meristemo.
- 7.2. Los meristemos como las puntas meristemáticas iniciadas sobre medios líquidos de inducción presentan una menor acumulación de sustancias fenólicas sobre el área de corte por lo que presentan una mejor apariencia en cuanto a su coloración y menor oxidación.
- 7.3. El medio basal MS tanto en medios de inducción como en medios de desarrollo presenta un mayor porcentaje de respuesta sobre el crecimiento del explante que el medio basal WPM.
- 7.4. Los medios de inducción líquidos suplementados con 1 mg/lt de GA3 presentan una mayor respuesta a la elongación y desarrollo del meristemo tanto para el medio basal MS como para el WPM.
- 7.5. Las puntas meristemáticas respondieron a la elongación y desarrollo de brotes en diferentes tratamientos, el mejor en cuanto a porcentaje de respuesta y tamaño del brote fue el tratamiento que incluye un medio líquido de inducción suplementado con 1 mg/lt de GA3 y un medio sólido de desarrollo suplementado con 2 mg/lt de BAP y 0.5 mg/lt de ANA en medio basal MS.
- 7.6 Todos los brotes producidos poseían hojas vitrificadas lo que limita la elongación y desarrollo de los mismos e impidió la regeneración y multiplicación de plantas.
- 7.7. Callos semicompactos de color verde con embrioides son producidos en medios basales MS, que incluye: Un medio líquido de inducción suplementado con 0.8 o 0.5 mg/lt de GA3 y un medio sólido de desarrollo suplementado con 2 mg/lt de BAP más 0.5 mg/lt de ANA más 0.5 mg/lt de GA3.

7.8. Los explantes de hoja no mostraron respuesta organogénica cuando fueron cultivados en medios con ANA y BAP en diferentes concentraciones con medios basales MS ,

9. BIBLIOGRAFIA

1. ARÉVALO MORALES, A.D. 1993. Evaluación de la respuesta a la inducción de callo de gipsofilia (*Gipsofilia paniculata.*), utilizando diferentes explantes y tratamientos de auxinas y citocininas en condiciones diferentes de luz. Tesis Ing.Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 66 p.
2. AZURDIA, C.; AYALA, H.; TAMBITO, E. 1995. El Zapote una especie de importancia en el bosque húmedo subtropical cálido. Boletín de Recursos Fitogénéticos (Gua.) no 9:5
3. BIDWELL R, G.S. 1979. Fisiología vegetal. Trad. Guadalupe Cano. México, AGT. 772 p.
4. BURGARIN, M.; LOZOYA, H. 1992. Propagación in-vitro del protainjerto rosa *Noisettiana.* a partir de yemas axilares. Revista Champingo (Méx.) 78 (12) : 39-43
5. COCKSHUTT, B. et al. 1991. Pantains mamey, new mameys cultivars. Tropical Fruit World (EE.UU.) 2 (1): 36-101
6. DODDS, H.; ROBERTS, L. 1986. Experiments in plant tissue culture. 2 ed. EE.UU., Cambridge University Press. 232 p.
7. ESCALANT, J.V.; ASTROGA, C. 1995. Desarrollo de métodos de propagación *in vitro* de zapote (*Pouteria sapota* L.Cronquist). Informe bianual 1994-1995. Turrialba, C.R., CATIE, Arrea de Agricultura Tropical Sostenible, Unidad de Biotecnología. s.p.
8. EVANS, D. et al. 1983. Handbook of plant and cell culture. EE.UU, Macmillan Publishing. vol. 2,3,4 y 5. 2,000 p.
9. FAO (Italia). 1992. Cultivos marginados, otra perspectiva de 1492. Milan, Italia. 323 p.
10. GARCIA TELLO, W.E. 1993. Estudio de la respuesta del pinabete (*Abies guatemalensis*) a su reproducción vegetativa *in vitro*, usando 2 medios de cultivo, 2 tipos de explante y 6 combinaciones hormonales. Tesis Ing.Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 66 p.
11. HARTMAN, H.T.; KESTER, D.T. 1989. Propagación de plantas. Trad. Antonio Marino. México, Continental. 760 p.
12. IICA (C.R.). 1987. Tecnología del cultivo de tejidos en café. Costa Rica. vol 1 y 2 p. 36-85.
13. JONES, S. 1988. Sistemática vegetal. 2 ed. Trad. María Huesca. México, Mc Graw Hill. 481 p.
14. LEON, J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. Costa Rica, IICA. 445 p.

10. APENDICE.

APENDICE .1.

CUADRO 18: Componentes de los medios M.S. y WPM.

Grupo	Compuesto	MS.	WPM
A. 56	NH ₄ NO ₃ KNO ₃ Ca(NO ₃ ·4H ₂ O	165 mg/l. 190 mg/l	40mg/l ---- 55.6mg/l
B.	K ₂ SO ₄ MgSO ₄ ·7H ₂ O MnSO ₄ ·H ₂ O ZnSO ₄ ·7H ₂ O CuSO ₄ ·5H ₂ O NH ₄ SO ₄	---- 37mg/l 1.69mg/l 0.86mg/l 0.0025mg/l ----	99mg/l 37mg/l 2.23mg/l 0.86mg/l 0.0025mg/l ----
C.	CaCl ₂ ·2H ₂ O KI CoCl ₂ ·6H ₂ O	44mg/l 0.083mg/l 0.0025mg/l	9.6mg/l --- ----
D.	KH ₂ PO ₄ H ₂ BO ₃ Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O Na ₂ H ₂ PO ₄ ·H ₂ O	17mg/l 0.62mg/l 0.025mg/l ---	17mg/l 0.62mg/l 0.025mg/l ----
E.	FeSO ₄ Na ₂ -EDTA	2.78mg/l 3.724mg/l	2.78mg/l 3.73mg/l
F.	Tiamina HCL Acidonicotínico Piridoxina HCL Glicina.	0.10mg/l 0.05mg/l 0.05mg/l 0.20mg/l	0.10mg/l 0.05mg/l 0.05mg/l 0.20mg/l
G.	Mioinositol	10mg/l	10mg/l
H.	Agar 0.6%	6gr/l	6gr/l
I.	Sucrosa.	30 gr/l	30gr/l.

Fuente: Hartman; Propagacion de Plantas (10)

APENDICE 2

Cuadro 19: Resultados de desinfección de hojas:

TRATAMIENTOS	# DE EXPLANTES	NO CONTAMINADOS	%	NO OXIDADOS	%
Pequeñas I					
1	3	0	0	2	50
2	4	3	75	4	100
3	4	3	75	4	100
4	4	3	75	2	50
TOTAL	15	9	56.25	12	80
Medianas I					
1	4	3	75	4	100
2	4	2	50	3	75
3	4	0	0	0	0
4	4	4	100	4	100
TOTAL	16	9	56.25	11	68.75
Grandes I					
1	4	0	0	1	25
2	4	2	50	3	75
3	4	1	25	3	75
4	4	0	0	1	75
TOTAL	16	3	18.75	8	50
Pequeñas II					
1	4	3	75	4	100
2	4	3	75	4	100
3	4	2	50	4	100
4	4	4	100	4	100
TOTAL	16	12	75	16	100
Medianas II					
1	4	2	50	3	75
2	4	0	0	1	25
3	4	0	0	1	25
4	4	3	75	4	100
TOTAL	16	5	31.25	9	56.25
Grandes II					
1	4	1	25	2	50
2	4	0	0	1	25
3	4	1	25	0	0
4	4	0	0	0	0
TOTAL	16	2	12.5	3	18.75
Pequeñas III					
1	4	2	50	1	25
2	4	3	75	2	50
3	4	2	50	1	25
4	4	3	75	2	50
TOTAL	16	10	62.5	6	37.5
Medianas III					
1	4	2	50	1	25
2	4	0	0	1	25
3	4	3	75	1	25
4	4	2	50	3	75
TOTAL	16	7	43.75	6	37.5

Continuación cuadro 19.

TRATAMIENTOS	# DE EXPLANTES	NO CONTAMINADOS	%	NO OXIDADOS	%
Grandes III					
1	4	3	75	2	50
2	4	0	0	2	50
3	4	3	75	2	50
4	4	2	50	1	25
TOTAL	16	8	50	7	43.75
Pequeñas IV					
1	4	4	100	3	75
2	4	4	100	3	75
3	4	3	75	3	75
4	4	2	50	3	75
TOTAL	16	13	81.25	12	75
Medianas IV					
1	4	3	75	2	50
2	4	3	75	3	75
3	4	2	50	3	75
4	4	3	75	2	25
TOTAL	16	11	68.75	10	62.5
Grandes IV					
1	4	3	75	1	25
2	4	2	50	0	0
3	4	3	75	2	50
4	4	3	75	2	50
TOTAL	16	11	68.75	5	31.25
Pequeños V					
1	4	4	100	3	75
2	4	4	100	4	100
3	4	4	100	3	75
4	4	4	100	4	100
TOTAL	16	16	100	14	87.5
Medianos V					
1	4	4	100	3	75
2	4	4	100	3	75
3	4	4	100	4	100
4	4	4	100	2	50
TOTAL	16	16	100	12	75
Grandes V					
1	4	4	100	2	50
2	4	4	100	3	75
3	4	4	100	3	75
4	4	4	100	1	25
TOTAL	16	16	100	9	56.25
Pequeñas VI					
1	4	4	100	4	100
2	4	4	100	4	100
3	4	4	100	4	100
4	4	4	100	3	75
TOTAL	16	16	100	15	93.75

Continuación cuadro 19.

TRATAMIENTOS	# DE EXPLANTES	NO CONTAMINADOS	%	NO OXIDADOS	%
Medianas VI					
1	4	4	100	4	100
2	4	4	100	3	75
3	4	4	100	3	75
4	4	4	100	4	100
TOTAL	16	16	100	14	87.5
Grandes VI					
1	4	4	100	3	75
2	4	4	100	2	50
3	4	3	75	3	75
4	4	4	100	3	75
TOTAL	16	15	93.75	11	68.75

Cuadro 20 : Resultados de desinfección explantes de hoja en base al tipo de tratamiento:

TRATAMIENTO	UNIDADES EXPERIMENTALES (U.E)	NUMERO DE EXPLANTES x U. E.	TOTAL DE EXPLANTES	EXPLANTES NO CONTAMINADOS	%	EXPLANTES NO OXIDADOS	%
1	10	4	47	21	44.68	31	65
2	10	4	48	19	35.98	28	58.33
3	10	4	48	25	52.08	19	39.58
4	10	4	48	35	72.97	27	56.25
5	10	4	48	48	100	35	72.92
6	10	4	48	47	98	40	83.33

Referencia:

1. Hipoclorito de sodio al 0.8% 10 minutos
2. Hipoclorito de sodio al 1.06% 10 minutos
3. Hipoclorito de sodio al 1.06% 15 minutos
4. Alcohol al 70% 2 minutos más hipoclorito de sodio al 0.8% 10 minutos
5. Alcohol al 70% 1 minuto más hipoclorito de sodio al 1.06% 10 minutos.
6. Alcohol al 70% 2 minutos más hipoclorito de sodio al 1.06% 10 minutos.

Cuadro 21: Resultado de desinfección de explantes de hoja en base al tamaño de la misma.

TAMANO DE HOJA	NUMERO DE EXPLANTES	EXPLANTES NO CONTAMINADOS	% EXPLANTES NO OXIDADOS	%
Pequeñas	95	76	80	78.94
Medianas	96	64	66.67	66.67
Grandes	96	55	57.29	50

Cuadro 22: Respuesta de los meristematos a distintos tratamientos de desinfección.

Nº	TRATAMIENTOS	NUMERO DE EXPLANTES	EXPLANTES NO CONTAMINADOS	%	EXPLANTES NO OXIDADOS	%
1	Hipoclorito de sodio al 0.53% 10 minutos	10	4	40	3	30
2	Hipoclorito de sodio al 0.8% 10 minutos	10	4	40	7	70
3	Hipoclorito de sodio al 1.06% 10 minutos	10	10	100	5	50
4	Hipoclorito de sodio al 0.53% 15 minutos	10	4	40	6	60
5	Hipoclorito de sodio al 0.8% 15 minutos	10	8	80	4	40
6	Hipoclorito de sodio al 1.06% 15 minutos	10	10	100	5	50
7	Alcohol al 70% 30 segundos	10	8	80	5	50
8	Alcohol al 70% 1 minuto	10	8	80	5	50
9	Alcohol al 70% 2 minutos	10	0	100	6	60
10	Alcohol al 70% 1 min. + hipoclorito de sodio al 0.53% 10 min	10	10	100	8	80
11	Alcohol al 70% 1 min + hipoclorito de sodio al 0.8% 10 min	10	0	100	6	60
12	Hipoclorito de sodio al 0.53% 15 min. + A.C. + C.A.	10	7	70	6	60
13	Hipoclorito de sodio al 0.8% 15 min. + A.C. + C.A.	10	8	80	7	70
14	Hipoclorito de sodio al 1.06% 15 min. + A.C. + C.A.	10	10	100	8	80

Referencias: A.C.= Acido Cítrico a 150 mg/lt; C.A.= Carbón activado 1000 mg/lt.

APENDICE 3.

COLECCION
<p>Epoca: La comprendida entre el final de la estación de crecimiento e inicio de la nueva formación de brotes foliares (de enero a abril).</p> <p>Colecta: Entre las siete y nueve horas cortando las puntas de los tallos con un largo aproximado de 5 cm. transportándolas a bajas temperaturas en hielera con papel absorbente.</p>

DESINFECCION
<p>Hojas: alcohol al 70% por 1 minuto más hipoclorito de sodio al 1.06% por 10 minutos</p> <p>Puntas Apicales: hipoclorito de sodio al 1.06% por 15 minutos sumergiéndolo los explantes en ácido cítrico (1.50 mg/lit)</p>

TRATAMIENTO	RESPUESTA
<p>Hojas: Ninguno</p>	<p>Ninguna:</p>
<p>Meristemos: A) Medio de inducción MS suplementado con 1 mg/lit de GA3 más carbón activado (1000 mg/lit)</p> <p>A.1) Medio de desarrollo MS suplementado con 10 2mg/lit de BAP más 0.5 mg/lit de ANA con carbón activado (1000 mg/lit)</p> <p>A.2) Medio de desarrollo MS suplementado con 1 mg/lit de BAP más 0.5 mg/lit de ANA más 0.5 mg/lit de GA3 con carbón activado (1000 mg/lit)</p>	<p>Elongación</p> <p>Brotos</p> <p>Callos semicompactos de color verde con puntos de crecimiento oscuros</p>

Cuadro 23 : Cuadro resumen de la Investigación "Respuesta de dos diferentes tipos de explantes de zapote (*Pouteria sapota* L. Cronquist) a diferentes medios de cultivo *in vitro*"



LA TESIS TITULADA: "RESPUESTA DE DOS DIFERENTES TIPOS DE EXPLANTE DE ZAPOTE
 (Pouteria sapota L. Cronquist) A DIFERENTES MEDIOS DE
 CULTIVO IN VITRO".

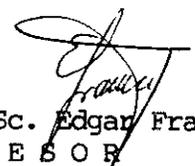
DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: CARLOS ESTUARDO ROCA CANET

CARNET No: 8917082

HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Oscar Leiva
 Ing. Agr. Eduardo Pretzanzin
 Ing. Agr. Domingo Amador

Los Asesores 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.

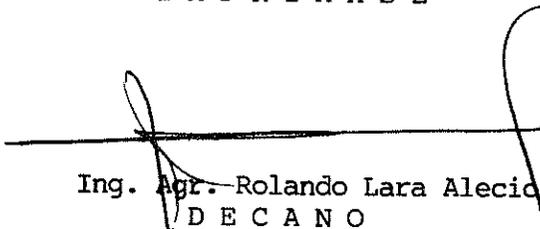

 Ing. Agr. Ana Dolores Arévalo
 ASESOR


 Ing. M.Sc. Edgar Franco
 ASESOR


 Ing. Agr. Fernando Rodríguez B.
 DIRECTOR DEL IIA.



I M P R I M A S E


 Ing. Agr. Rolando Lara Alecio
 DECANO



cc: Control Académico
 Archivo
 FR/prr.

APARTADO POSTAL 1545 • 01091 GUATEMALA, C. A.

TELEFONO: 769794 • FAX: (5022) 769770