

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

**RESPUESTA DE LA ZARZAPARRILLA (*Smilax domingensis* Willdenow)
A LA MICROPROPAGACION, UTILIZANDO TEJIDO EMBRIONARIO**

**TESIS
PRESENTADA A LA HONORABLE DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
AGRONOMIA DE UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

POR

NERY MAURICIO MENDOZA GAITAN

En el acto de investidura como

INGENIERO AGRONOMO

EN

**SISTEMA DE PRODUCCION AGRICOLA
EN EL GRADO ACADEMICO DE LICENCIADO**

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Bibliotecero Central

Guatemala, Mayo del 2,001

DL
01
+(1969)

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

Ing. Agr. EFRAIN MEDINA GUERRA

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

DECANO	Ing. Agr.	Edgar Oswaldo Franco Rivera
VOCAL PRIMERO	Ing. Agr.	Walter Estuardo García Tello
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr.	Manuel de Jesús Martínez Ovalle
VOCAL TERCERO	Ing. Agr.	Alejandro Arnoldo Hernández F.
VOCAL CUARTO	Prof.	Abelardo Caal Ich
VOCAL QUINTO	Br.	José Baldomero Sandoval A.
SECRETARIO	Ing. Agr.	Edil René Rodríguez Quezada

Guatemala, Abril del 2001

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

Distinguidos miembros:

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 LA ZARZAPARRILLA (*Smilax domingensis* Willdenow) A LA MICROPROPAGACION, UTILIZANDO TEJIDO EMBRIONARIO

Presentando como requisito previo a optar el Título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción agrícola, en el grado Académico de Licenciado.

En espera de su aprobación, me es grato presentarles mi agradecimiento.

Atentamente



NERY MAURICIO MENDOZA GAITAN



ACTO QUE DEDICO

A:

DIOS: CREADOR DEL UNIVERSO

MIS ABUELOS: MIGUEL ANGEL MENDOZA CARDONA (QEPD)
LUISA VIDALIA GUDIEL DE MENDOZA
JOSÉ VICTOR GAITAN (QEPD)
MARGARITA FLORES DE GAITAN

MI PADRE: EMIGDIO ENRIQUE MENDOZA GUDIEL
POR SER EJEMPLO DE HONESTIDAD

MI MADRE: MARIA REGINA GAITAN FLORES
COMO UN RECONOCIMIENTO A SUS MULTIPLES
SACRIFICIOS

MIS HERMANOS: ILSY MARLENY Y EMIGDIO ENRIQUE
POR SU GRAN APOYO

MIS SOBRINOS: LUIS GABRIEL, KEVIN ASDRUAL Y
MARIA REGINA

MIS CUÑADOS: LUIS ARTURO ALBUREZ Y ROSA ELENA CHANG.

MIS AMIGOS: POR HABER COMPARTIDO BUENOS MOMENTOS
AGRADABLES

TESIS QUE DEDICO

A:

MI PATRIA GUATEMALA

MI PUEBLO, CHIQUIMULILLA

LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

LA FACULTAD DE AGRONOMIA, mi casa de estudio

COLEGIO LA "LA SALLE", ANTIGUA GUATEMALA

INDICE

1. Introducción	1
2. Definición del problema	2
3. Justificación	3
4. Marco Conceptual	4
4.1. Las plantas medicinales	4
4.2. Sustancias activas de las plantas medicinales	4
4.2.1. Alcaloides	5
4.2.2. Flavonoides	5
4.2.3. Sesquiterpenlactanos	5
4.2.4. Lignanos	5
4.2.5. Quinonas	5
4.2.6. Saponinas	6
4.2.7. Aceites esenciales	6
4.3. Comercialización de las plantas medicinales	6
4.4. Peligro de extinción de las especies	7
4.5. Descripción general de la zarzaparrilla (<i>Smilax spp</i>)	8
4.5.1. Descripción del género <i>Smilax</i>	8
4.5.2. Diagnósis Taxonómica	9
4.5.3. Usos medicinales de la zarzaparrilla	10
4.5.4. Descripción de la especie <i>Smilax domingensis</i> Willdenow.	11
4.6. Fundamentos y aplicación del cultivo de tejidos vegetales	12
4.6.1. Asepsia	12
4.6.2. Medios nutritivos	13
4.6.3. Ambiente de incubación	13
4.6.3.A. Efecto de luz	13
4.6.3.B. Efecto de temperatura	14
4.7. Aplicaciones agrícolas	14
4.8. Aspectos generales de la regeneración <i>in vitro</i>	14
4.9. Factores que influyen en el cultivo <i>in vitro</i>	14
4.9.1. Composición química del medio	15
4.9.2. Sales minerales	15
4.9.3. Vitaminas	15
4.9.4. Carbohidratos	15
4.9.5. Reguladores de crecimiento	15
4.9.5.A. Auxinas	16
4.9.5.A.a. Transporte de auxinas	16
4.9.5.A.b. Efecto de las auxinas sobre las raíces y formación de raíces	17

4.9.5.A.c. Posibles mecanismos de acción de las auxinas	18
4.9.5.B. Citocininas	18
4.9.5.B.a. Metabolismo de la citocininas	18
4.9.5.B.b. Sitios de síntesis y transporte de citocininas	18
4.9.5.B.c. División celular y formación de órganos promovidos por citocininas	19
4.9.5.B.d. Efecto de las citocininas sobre tallos y raíces	19
4.9.5.B.e. Mecanismo de acción de las citocininas	20
4.10. Ventajas y desventajas de la micropropagación	20
4.11. Ventajas	21
4.12. El embrión cigótico en los vegetales	21
4.13. Cultivo de embriones <i>in vitro</i>	21
4.14. Medio nutritivo artificial de cultivo	22
4.15. Organogénesis	22
4.16. La semilla	23
4.16.1. Cubierta seminal	23
4.16.2. Endosperma	24
4.16.3. Relación embrión-endosperma	24
4.16.4. Embrión	25
4.16.4.A. Diferenciación del embrión	25
4.16.4.B. Desviaciones embrionicas	25
5. Objetivos	27
6. Hipótesis	28
7. Materiales y métodos	29
7.1. Tratamientos	29
7.2. Unidad experimental	30
7.3. Modelo Estadístico	30
7.3.1. Modelo Completamente al Azar	30
7.3.2. Modelo Factorial	30
7.4. Comparación de Medias (Tukey)	31
7.5. Equipo y cristalería	32
7.6. Selección del material experimental	32
7.7. Desinfección del explante	33
7.8. Selección y preparación del medio basal	33
7.9. Esterilización del medio de cultivo	34
7.10. Reposo en agua	34
7.11. Siembra del tejido en el medio de cultivo	34
7.12. Incubación de los cultivos	34
7.13. Variables a evaluar	37
7.13.1. Tipo de respuesta de cada explante	37

7.13.2. Brotes por explante	37
7.14. Análisis de datos	37
8. Resultados y discusión de resultados	38
8.1. Germinación y desarrollo	38
8.2. Envoltura de embriones desarrollados	38
8.3. Cultivo con MS y otras concentraciones de reguladores de crecimiento	39
8.4. Porcentaje de cultivos sanos	40
8.5. Porcentaje de cultivos desarrollados	42
8.6. Porcentaje de cultivos muertos	45
8.7. Control ambiental de la germinación	49
9. Conclusiones	53
10. Recomendaciones	54
11. Bibliografía	55

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Plantas medicinales de mayor comercialización para exportar	7
CUADRO 2. Clasificación botánica de zarzaparrilla (<i>Smilax domingensis</i> Willdenow)	10
CUADRO 3. Formación hormonal de los tratamientos	29
CUADRO 4. Distribución de las unidades experimentales	32
CUADRO 5. Composición del medio de cultivo basal	36
CUADRO 6. Unidades experimentales contaminadas de cultivo in vitro de embriones de Zarzaparrilla	40
CUADRO 7. Tratamientos que respondieron al cultivo in vitro de zarzaparrilla	42
CUADRO 8. Embriones de zarzaparrilla muertos durante el proceso de siembra	45

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Partes de la semilla de <i>Smilax domingensis</i> Willdenow.	26
FIGURA 2.3. Fotografía de los embriones que respondieron y desarrollaron satisfactoriamente	44
FIGURA 4. Embriones desarrollados	47

INDICE DE GRAFICAS

GRAFICA 1. Porcentaje de cultivos sanos	41
GRAFICA 2. Porcentaje de cultivos desarrollados	43
GRAFICA 3. Porcentaje de cultivos muertos	46

RESUMEN

RESPUESTA DE LA ZARZAPARRILLA (*Smilax domingensis* Willdenow) A LA MICROPROPAGACION, UTILIZANDO TEJIDO EMBRIONARIO

RESPONSE OF ZARZAPARRILLA (*Smilax domingensis* Willdenow) TO THE MICROPROPAGATION, USING EMBRYO TISSUE

La zarzaparrilla (*Smilax domingensis* Willdenow), con sus sinónimos: *S. caudata*, *S. lanceolata* y *S. microscola*, con importancia económica, es utilizada como planta medicinal, con propiedades antisépticas, antiinflamatorias, cicatrizantes, desinflamantes, diurético, depurativo, sudorífica y tónica.

Esta planta se encuentra desde la Costa Sur con una franja de 40 a 50 kilómetros de ancho que va desde México hasta Oratorio y Santa María Ixhuatán en Santa Rosa. Presenta bajo porcentaje de germinación, cuando su propagación es por semilla y su poca respuesta a la propagación vegetativa, por acodos, por rizoma, por esquejes y por injertos. No llena la demanda que tiene en el mercado. La mayoría de los rizomas que se utilizan en la elaboración de medicamentos a base de zarzaparrilla es extraído en áreas silvestres ocasionando un desgaste germoplasmico de la especie.

Como alternativa de propagación se cultivaron embriones cigóticos en un medio de cultivo Murashige & Skooge complementado con reguladores de crecimiento: ácido naftalanacético ANA y bencil aminopurina BAP en diferentes concentraciones, aunque también se le aplico ácido giberélico como promotor de la germinación, para evaluar la respuesta. El resultado de esta investigación lo constituye el bajo porcentaje de germinación de los embriones, bajo las condiciones de este experimento, los tratamientos sobresalientes con dos repeticiones con respuesta de diez que se realizaron por cada tratamiento: 0.1 BAP / 0.50 ANA, y 1.5 BAP / 0.50 ANA.

De acuerdo a la morfología las semillas de zarzaparrilla poseen un embrión rudimentario, pequeño con un endospermo abundante.

1. INTRODUCCION

Smilax domingensis conocida en el área de estudio como: *S. caudata*, *S. lanceolata* y *S. microscola*, y sus nombres comunes en el área: Bejuco de la vida, Bejuco de canasta, Zarzaparrilla, Corona de cristo, diente de chucho, es de importancia económica, pues se utiliza como planta medicinal con propiedades: Antisépticas, antiinflamatorias, antifúngicas, antipruríticas, antirreumática, cicatrizante, desinflamante, diurético, diaforético, depurativa, sudorífica y tónica.

Con el fin de evaluar varios tratamientos de combinaciones de reguladores de crecimiento, en un medio de cultivo, que presenta elementos mayores, elementos menores y vitaminas, se inoculó con el tejido de embrión cigótico de *Smilax domingensis*, el cual por medio de organogénesis que se desarrollo y produjo una planta. Se utilizó el material y equipo necesario, adecuado para este ensayo, en las instalaciones del laboratorio de micropropagación de la Facultad de Agronomía. El tiempo que duró este ensayo fue de catorce semanas a tiempo completo, para observar los cambios que se produjeron durante su desarrollo.

Se tiene conocimiento en cuanto a dificultades de las diferentes especies de zarzaparrilla para su propagación utilizando material vegetativo, como acodos, estacas o mediante su propagación sexual. Aunado a esto la forma de recolección de plantas en su hábitat naturales, pues de ellas se aprovecha casi exclusivamente las raíces y los rizomas más grandes, y que colocan a dichas especies en peligro de extinción.

2. DEFINICION DEL PROBLEMA

La especie *Smilax domingensis* se utiliza como planta medicinal en el área mesoamericana, con potencial a exportarse a otros países como Estados Unidos y Europa. Esto causa que la planta tenga una mayor demanda, pues esta especie tienen problemas de reproducción natural, lo que la hace ser vulnerable a desaparecer en las áreas donde se encuentra.

La planta de zarzaparrilla (*Smilax domingensis*), para su aprovechamiento como planta medicinal, es de difícil propagación por métodos convencionales. El bajo porcentaje de semillas que germinan, por rizoma, por esqueje, por injerto, no han llenado los requerimientos. Actualmente para su aprovechamiento se recurre a su colecta en el bosque donde se le encuentra en su hábitat natural. Esa colecta se ha convertido en una explotación desmedida causando la pérdida de germoplasma de la especie.

3. JUSTIFICACION DEL TRABAJO

Es necesario desarrollar un trabajo de investigación con el objeto de buscar alternativas de propagación que contribuyan a una multiplicación eficiente de la zarzaparrilla (*Smilax domingensis*). Los resultados obtenidos vendrán a coadyuvar a la generación de tecnología para el cultivo de la zarzaparrilla sin depredar el bosque, por el contrario a regenerarlo debido a que la planta de zarzaparrilla, para su crecimiento y producción necesita de las condiciones del bosque.

Una de las alternativas para la multiplicación vegetativa de la zarzaparrilla, es la micropropagación, tema principal de este trabajo de investigación. La micropropagación, consiste en el cultivo de partes de la planta en condiciones adecuadas controladas, para que tenga un desarrollo satisfactorio. Se usaron embriones cigóticos, por la razón que es un tejido aséptico (se encuentra cubierto por el endosperma), es una planta silvestre que se encuentra en el bosque, y existe gran cantidad de organismos que pueden afectarla y contaminar el medio de cultivo.

4. MARCO CONCEPTUAL

4.1. LAS PLANTAS MEDICINALES

Según Muñoz (15), las plantas medicinales son aquellos vegetales que elaboran unos productos llamados principios activos que son sustancias que ejercen una acción farmacológica beneficiosa o perjudicial sobre el organismo vivo. Su utilidad es servir como droga o medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud perdida.

Sin embargo, se ha establecido que son relativamente pocas las plantas medicinales cultivadas, la mayor parte de la producción de droga se obtienen de plantas que crecen en forma silvestre en diversas partes del mundo, especialmente en los trópicos. Por lo general estas plantas son recolectadas y preparadas de forma rudimentaria para su embarque y se envía a los centros de comercio de Europa y el resto de América. La manipulación del material en bruto, según Hill, se lleva a cabo sobre todo en los Estados Unidos, que además producen varias drogas, ya sea de plantas silvestres o cultivadas, entre ellas se mencionan: ginseng, la cáscara sagrada, el cáñamo y el sello de oro. Otras especies como la belladona, el beleño y el santónico, se cultivan durante el periodo de escasez.

El valor medicinal de todas estas plantas se debe a la presencia en sus tejidos de alguna o varias sustancias químicas que producen una acción fisiológica concreta sobre el cuerpo humano. Entre ellas, las más importantes son: los alcaloides, los glucósidos, los aceites esenciales. Los aceites grasos, las resinas, los mucilagos, las gomas. Algunas de estas sustancias son venenos poderosos, de manera que la preparación y administración de tales drogas debiera dejarse por entero en manos de expertos farmacólogos o médicos.

4.2 SUSTANCIAS ACTIVAS DE LAS PLANTAS MEDICINALES

Según Pahlow (17), los principios activos de las plantas medicinales son sustancias que la planta ha sintetizado y almacenado en el transcurso de su crecimiento con ayuda del metabolismo. Sin embargo, no todos estos productos metabólicos tienen un valor medicinal directamente.

Los principios activos no se distribuyen de una manera uniforme por toda la planta, se encuentran en diferentes partes: en las flores, las hojas o raíces y a veces en los frutos o en la corteza.

Existen dos tipos de sustancias activas en las plantas: los productos del metabolismo primario (sacáridos principales), que son sustancias formadas en todas las plantas verdes gracias a la fotosíntesis. El segundo tipo de sustancias está compuesto por productos del metabolismo secundario. Es decir, resultado de procesos originados principalmente por la asimilación del nitrógeno, se trata por ejemplo, de aceites esenciales (esencias naturales), resinas y alcaloides, tales como del cornezuelo o del opio (25).

4.2.1. ALCALOIDES

Los alcaloides constituyen un grupo muy heterogéneo de bases vegetales nitrogenadas compleja, de naturaleza básica, que provocan en general efectos fisiológicos en los animales. Se trata en su mayor parte, de venenos vegetales muy activos dotados de una acción muy específica, por ejemplo: los alcaloides quinoléicos del pedúnculo foliado de la ruda.

Los alcaloides aparecen en muy diversas familias de plantas, unas 256 en los hongos, algas y otros vegetales inferiores (5).

4.2.2. FLAVONOIDES Y COMPUESTOS AFINES

Los flavonoides son pigmentos vegetales que poseen un esqueleto carbónico $C_6-C_3-C_6$. Se conocen unos 900 flavonoides naturales, se encuentran extensamente distribuidos entre las plantas, tanto libres como glicósidos, estos últimos contribuyen a darle color a las flores, frutos y hojas. Las agliconas son más frecuentes en los tejidos leñosos. Los flavonoides son sintetizados por numerosos grupos de plantas y con excepción de algunas flavonas localizadas en las alas de las mariposas, probablemente por ingestión, se puede decir que no se encuentra en animales (5).

4.2.3. SESQUITERPENLACTONAS

Las sesquiterpenlactonas se han encontrado principalmente en los extractos de flores y partes aéreas de las plantas compuestas, siendo lo suficientemente típicos por tener cierto valor quimiotaxónomico. También se han encontrado en algunas umbelíferas (5).

4.2.4. LIGNANOS

Los lignanos pueden considerarse como dímeros oxigenados del fenilpropano (C_6-C_3), se conocen más de 60 lignanos todos aislados de las fanerógamas. Muchos se han obtenido como glicósidos, y se han aislado en todos los órganos vegetales, algunos son tóxicos y otros inocuos. Todos son ópticamente activos. Los lignanos son sólidos coloros, cuyos puntos de fusión van de 64 hasta cerca de 300 grados centígrados (5).

4.2.5. QUINONAS

Las quinonas son dicetonas insaturadas que por reducción se convierten en polifenoles los que fácilmente se generan por oxidación. Se han aislado unas 300 quinonas. Por sus colores, amarillo a violeta contribuyen a la pigmentación de numerosos vegetales y de algunos animales. Algunas como la vitamina K, la ubiquinona (coenzima Q) y las plastoquinonas intervienen en los fenómenos respiratorios, transportando electrones, por lo que se les encuentra en todos los seres vivos. Alrededor de la mitad de las quinonas conocida se han

encontrado en las angiospermas, otras tantas en hongos y vegetales unicelulares, por el sistema aromático que dan al reducirse se les puede dividir en benzoquinonas, naftaquinonas, antraquinonas y en fenantraquinonas.

Entre las plantas usadas en el pasado para teñir fibras, la raíz de rubia (*Rubia tinctorium*) (5).

4.2.6. SAPONINAS

Son glicósidos vegetales que junto con el agua dan una espuma permanente, que emulsionan el aceite en el agua que poseen un efecto hemolítico, es decir, que extrae de los glóbulos rojos el colorante del mismo color.

Las saponinas son muy frecuentes en plantas medicinales, su principal propiedad física es la fuerte reducción de la tensión superficial del agua. De la célebre raíz de ginseng (*Panax ginseng*) originaria de China y Corea y de la raíz de la zarzaparrilla se han aislado saponinas.

Las saponinas influyen en las plantas medicinales de un modo decisivo sobre la reacción de otros principios activos vegetales, y es muy frecuente que pequeñas cantidades produzcan "grandes" resultados. Pero las saponinas no son del todo inofensivas, un exceso, podría provocar efectos perjudiciales al organismo (5).

4.2.7. ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales o esencias vegetales son mezclas de un número variable de sustancias orgánicas olorosas, un líquido volátil, ópticamente activos, próximos a los aceites, con olor especialmente característicos. Se forman como subproducto del metabolismo secundario de un número de plantas.

Estos aceites se acumulan en determinados tejidos, en el interior de células o en depósitos de esencias, debajo de la epidermis de los pelos, de las glándulas o en los espacios intercelulares (5).

4.3. COMERCIALIZACION DE LAS PLANTAS MEDICINALES

En Guatemala se comercializan alrededor de 200 plantas medicinales. Su presentación es diversa y se venden en puestos ambulantes, mercados cantonales, laboratorios, droguerías, centros naturistas, supermercados y clínicas. En el país funcionan ocho laboratorios que producen alrededor de 115 productos fitofarmacéuticos, los cuales satisfacen únicamente el 5% de la demanda del mercado nacional. A continuación en el cuadro 1, se presenta una lista de plantas medicinales con demanda internacional.

CUADRO 1. Plantas medicinales con demandas internacionales (FARMAYA).

Especie	mercado	producto
Aloe vera	USA, Alemania	filete fresco
Aloe vera	Canadá, Asia	polvo de hoja
Aloe vera	USA	concentrado
Bixa orellana	Europa	semilla
Capsicum spp	USA, Europa	fruto
Cinchona pubescens	Europa	corteza
Cúrcuma longa	Europa	rizoma
Cymbopogon citratus	Europa	aceite
Dioscorea spp	Europa	rizoma
Elettaria cardamomum	Europa, Canadá	semilla
Hibiscus sabdariffa	Centro America	corola
Smilax spp.	Europa	rizoma
Zingiber	USA, Europa	rizoma
Tagetes lucida	Centro América	deshidratado
Petiveria alliaceae	Europa	deshidratado

4.4. PELIGRO DE EXTINCION DE LAS ESPECIES

Principalmente las especies silvestres, se obtienen por medio de colectas en los bosques. Algunas de estas especies esta sufriendo erosión genética acelerada; Es decir, que están perdiendo su variabilidad, pues se colectan los mejores ejemplares perdiendo de esa manera la reducción o la eliminación del patrimonio genético de las poblaciones silvestres, principalmente como consecuencia de los altos volúmenes de extracción en sus ambientes naturales. Tal es el caso de: *Tagetes lucida* (pericón), *Lippi dulcis* (orozús), y *Petriveria alliacea* (azapín) (16).

Orellana, Perla y Herrera, indican que aunque no existen datos de estudios sobre peligro de extinción de algunas de estas especies, observaciones preliminares indican que aparentemente las zarzaparrillas (*Smilax sp*) y dioscoreas (*Dioscoreas spp*), podrán ser consideradas dentro de esta categoría.

El cultivo de plantas medicinales que hasta hoy existe en Guatemala se da en huertos familiares, huertos comerciales y en cultivos de fincas (16).

4.5. DESCRIPCION GENERAL DE LA ZARZAPARRILLA (*Smilax* sp)

Las plantas de zarzaparrilla (*Smilax* sp), también conocida en Guatemala, con los nombres de zarzaparrilla y bejuco de la vida en Santa Rosa, Jalapa y Quetzaltenango; zarzaparrilla, curlo y corona de cristo en Sacatepeques; zarzaparrilla y diente de chucho en San Marcos y Alta Verapaz; palo de la vida en Suchitepéquez; ña de gato en algunos lugares de Alta Verapaz y Suchitepéquez; zarzaparrilla en Sololá; quix en Huehuetenango; sinaca en Izabal y cuculma roja en Petén. Pertenece a la familia Smilacaceae, que comprende por lo general plantas arbustivas y trepadoras, a veces herbáceas o erectas, rizomatosas, frecuentemente provistas de zarcillos y/o espinosas (16).

La zarzaparrilla es una planta perenne, que trepa como un bejuco hasta la copa de los árboles, alargándose menos en lugares descubiertos, formando una maraña difícil de atravesar por que se ase a cuanto encuentra a su alcance por medio de zarcillos. Su porción subterránea esta constituida por un rizoma que genera raíces.

La planta en su parte aérea tiene ramas delgadas, angulosas, más o menos espinosas que crecen en zigzag, las hojas se encuentran esparcidas a lo largo del tallo y son coriáceas de forma extremadamente variada, por lo general con base acorazada, a veces muy ancha, otras veces muy estrecha y prolongadas. Las flores son unisexuales, raras veces son hermafroditas y por lo común son pequeñas. Las flores masculinas representan seis estambres, a veces mayor o menor, Las flores femeninas se componen de un ovario supero triocular con 1 ó 2 óvulos; el ovario es rudimentario y puede estar presente o ausente. El fruto es carnoso con 1 a 3 semillas de embrión pequeño y endospermo óseo (2).

En Guatemala la planta de zarzaparrilla es extraída o recolectada en las zonas de crecimiento natural de las especies, es por ello que observaciones preliminares indican que aparentemente las zarzaparrillas (*Smilax* sp) se encuentran amenazadas o en peligro de extinción.

Se considera que posee propiedades antimicrobianas, tónicas, depurativas, febrífugas, antimaláricas. Se han podido demostrar sus propiedades. En nuestro país la zarzaparrilla (*Smilax* sp), es comercializada en forma de extracto líquido, pomada, tintura, deshidratada en bolsa, tinasa y en cápsulas. En la actualidad se comercializan sus rizomas hacia Europa, es por esta razón que se considera a la zarzaparrilla junto a otras plantas, como plantas medicinales prioritarias a Guatemala (2).

4.5.1. DESCRIPCION DEL GENERO SMILAX

En cuanto a la clasificación en la sistemática actual , la zarzaparrilla pertenece a la familia Smilacaceae, dentro de la cual se reconocen 4 géneros de los cuales 3 comprenden pocas especies y de área geográfica restringida a Australia: *Heterosmilax* con 15 especies, *Rhipogonum* con 7 especies y *Pseudosmilax* con 2 especies. Mientras que el cuarto género *Smilax*, tiene una amplia distribución en ambos hemisferios y reúne entre 200 y 350 especies, primordialmente en zonas tropicales y subtropicales, extendiéndose en algunos casos a zonas templadas.

El género *Smilax* comprende plantas dioicas, herbáceas o más comúnmente arbustiva trepadoras y con frecuencia de varios metros de largo. Están provistos de rizomas o de tubérculos carnosos o leñosos. Los tallos y hojas a menudo presentan espinas aplanadas o cilíndricas, curvadas o erectas en ocasiones acompañadas también de espinas aciculares, rígidas, largas o finas. Las ramas son floríferas con 1 ó 2 catáfilos en la base. Las hojas son alternas, presentando peciolo persistente en forma de una vaina estipular cuyo extremo apical se prolonga en zarcillos.

Font en 1982, citado por Amador (2), menciona que las flores son pequeñas, de seis pétalos de color crema, las masculinas son de seis estambres y las femeninas con el pistilo ovoide. El fruto es una baya redondeada, sostenida por un corto pedúnculo de las dimensiones de un largo garbanzo, de color rojo mas o menos oscuro, o bien negro, cuando el fruto esta bien maduro. Todas las bayas originadas de una umbela floral forman un racimo a modo de un racimo de uvas, por tres semillas por fruto. Se considera muy dura si llega a madurar (2).

Este género está representado por 13 especies en nuestro país, según lo reporta la flora de Guatemala, consultada por Herrera, Perla y Moreno. Las especies de *Smilax* se semejan entre sí y por lo general se distinguen una de las otras en pocos rasgos. Esta situación complica su identificación, en particular por que son plantas dioicas, las flores al igual que los frutos son hefimeros, los tallos y las hojas de la porción basal de las plantas son distintos de las porciones distales (2).

4.5.2. DIAGNOSIS TAXONOMICA

Tallo aéreo, con entrenudo de 4 a 6 centímetro de longitud y 0.5 centímetro de diámetro, con aguijones triangulares, se observan ramas vigorosos y un profuso sistema de ramas más débiles con hojas, a veces de menor tamaño, la mayoría de estas ramas de color castaño y floríferas. Flores blanquecinas, peciolo con nectáreos cortos con zarcillos (Huff, 1994). Rizoma algo lignificado, voluminoso, con engrosamiento tuberoso, de color castaño, raíces adventicias naciendo de los rizomas rectas muy lignificadas, largas de un diámetro de 0.3- 0.4 centímetros de color pardo grisáceo, su hábitat o forma de vida enredadera, ramificada hasta 15 metros de largo cuando la planta es adulta, los tallos inferiores sin hojas y las ramas superiores densamente foliadas. Crece en bosques húmedos o secos de latifoliadas, en laredas, hondonadas y orillas de quebradas trepando sobre las ramas de los árboles. Planta perenne bajo condiciones naturales. Se ha indicado por parte de los agricultores, que puede producir un rizoma comercial de los 15 a 20 años en adelante, en observaciones de campo se ha podido comprobar que bajo condiciones adecuadas puede comenzar a producir a los 7 años (2). A continuación en el cuadro 2, se presenta la clasificación botánica de la zarzaparrilla.

CUADRO 2. Clasificación Botánica de *Smilax domingensis*

Reino	Vegetal
Subreino	Embryobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Subclase	Lilidae
Orden	Liliales
Familia	Smilacaceae
Género	Smilax
Especie	<i>domingensis</i> Willdenow <i>caudata</i> Lundell <i>lanceolata</i> Linneo <i>microscola</i> (Robinson) Killp

4.5. 3. USOS MEDICINALES DE LA ZARZAPARRILLA

Se tiene evidencia que la planta de zarzaparrilla era utilizada con fines medicinales por los mexicas, aztecas, zapotecas, mayas y totonacas; aunque no se conoce con precisión las dolencias que curaban con dichas especies. Los españoles encargados de los registros sobre la herbolaria indígena pronto observaron que se hallaban frente a las zarzaparrillas de América, cuyo uso medicinal creían conocer con exactitud.

La planta fue introducida en Europa por españoles en los inicios del siglo XVI, fue incluida en la farmacopea británica en 1864 y registrada con actividad antirreumática, antiséptica y antiprurifica (Rafatillah 1991; Trease y Evans 1988). En la farmacopea de los Estados Unidos, los principios activos de la planta fueron registrados en 1942. En la medicina greco-árabe los principios activos son todavía utilizados para tratamientos del hígado, inflamación y deficiencia renal. Las raíces y los rizomas de estas plantas han tenido diversos usos en la medicina tradicional como: tónica, antirreumática, diurético y para el tratamiento de enfermedades de la piel y el hígado (Rafatullah 1991, James 1985).

Duke, mencionado por Amador, también expone los usos tradicionales que se han dado a la zarzaparrilla que entre otros como: tonificantes sanguíneo, para combatir el cáncer, la lepra, la gonorrea, la sífilis, la fiebre y el reumatismo. Así también para contrarrestar problemas de obesidad, herpes, y del hígado. En la actualidad la aplicación más importante de la zarzaparrilla es en la industria farmacéutica donde se utiliza para facilitar la absorción de otros fármacos. La zarzaparrilla gozó en otro tiempo de gran reputación en el tratamiento de la sífilis, del reumatismo y de otras dolencias de la piel (James 1985, Trease & Evans 1988).

El género *Smilax* posee algunas especies de valor comercial de uso medicinal. Se le atribuyen las siguientes propiedades medicinales: estimulante y sudorífico, se le consideró un

gran remedio favorito para enfermedades generales. Además de los usos medicinales de la zarzaparrilla, algunos compuestos de la planta se emplean en la industria alimenticia, como saborizantes en confitería y en la elaboración de almibares. Por sus propiedades fisicoquímicas se utilizan como agente espumante en bebidas y como texturizante para dar consistencia a postres derivados de leche (Prince et al 1987).

Duke, citado por Amador, también menciona que los extractos de raíces son utilizados en México y el sur de los Estados Unidos en la preparación de bebidas refrescantes sin contenido de alcohol. Además en esta última región, el extracto de zarzaparrilla es mezclado con ginseg, jengibre y sarsafra para elaborar una bebida denominada "root booster" a la que se le atribuyen propiedades afrodisiacas. La zarzaparrilla contiene varios compuestos bioactivos como el sarsaparrillosido. Por hidrólisis de este compuesto se derivan las saponinas: parrillana, desglucodesramnoparrillina, desglucoparrillana y asparragósido A, principalmente contenidas en la raíz de la planta. Las propiedades bioactivas de la zarzaparrilla se le atribuyen a su contenido de saponinas (2).

Amador citando a Oakenfull y a Duke, expone que las saponinas son glicósidos que se encuentran principalmente en las plantas. Forman espuma jabonosa cuando son agitados en agua, característica que da el nombre al grupo compuesto del latín *sapo*=jabón. De manera similar otras características, por ejemplo actividad hemolítica, propiedades ligadas al colesterol y astringencia caracterizan a tipos particulares de saponinas, pero no compartidas por todos sus miembros. La zarzaparrilla es considerada una fuente importante de este tipo de compuestos para la industria farmacéutica actual (2).

4.5.4. DESCRIPCION DE LA ESPECIE *Smilax domingensis* willdenow

Con sinónimos: *Smilax caudata* Lundell, *Smilax lanceolata* Linneo, *Smilax microscota* (Robinson) Killip et Morton, con nombres comunes en el área: cuculmeca, cocolmeca en Guatemala, Costa Rica y México, zarzaparrilla, bejuco de la vida, china-root, curlo, diente de chucho, palo de la vida en Guatemala. *Smilax domingensis* se le atribuyen las siguientes propiedades: antiinflamatoria, antifúngica, antiprurítica, antirreumática, antiséptica, cicatrizante, desinflamatoria, estimulante, diurética, diaforética, depurativa, sudorífica y Tónica. El rizoma en cocimiento se utiliza por vía oral para tratar anemia afecciones gastrointestinales (Diarrea, dolor de estomago, inapetencia) hinchazón, malaria, dolor de riñones, enfermedad de la sangre y enfermedades venéreas, hepatitis, reumatismo y tumores.

Planta glabra completamente tallos terrestres, escasamente armados en la parte inferior, con agujones robustos recurvados inermes en la parte posterior. Hojas 6- 15 por 1.5- 10 cm; 1,4-6 veces más largas que anchas avadas lanceolado - avado, o lanceoladas, cartaceas, inermes 5 nervias desde la base, las nerviaduras primarias prominentes en el envés, no breviscupidado, la base aguda, margen entero, peciolo 0.5- a 1 cm de diámetro. Umbela subyacente, subterete, tépalos de las flores estaminadas, 4- 6 mm; Filamentos 2-4 mm

anteras 1-2 mm. Tépalos de las flores pistiladas cerca de 4 mm. Bayas 7-10 mm. de diámetro rojas o negras. Por cada baya de 1-3 semillas (2).

4.6. FUNDAMENTOS Y APLICACIONES DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.

El cultivo de tejidos vegetales identifica colectivamente todos los métodos de cultivar células, protoplastos, tejidos especializados y órganos completo, las características comunes más notables compartidas por estos métodos son la asepsia, la nutrición con medio de composición determinada y el desarrollo de un ambiente protegido y controlado. Todos ellos usan órganos o secciones de órganos como material inicial, pero la conservación o el desarrollo de características identificables con el órgano original es un requisito solo en cultivo de órganos.

El cultivo de tejidos vegetales empezó hace más de ochenta años, con los trabajos de Haberlandt; éste permaneció como una herramienta experimental de unos pocos botánicos hasta muy recientemente. Hoy en día este método es utilizado extensivamente tanto en agricultura como en botánica.

4.6.1. ASEPSIA

La aséptica es fundamental para el cultivo de tejidos vegetales. Todos los microorganismos asociados superficialmente, no infecciosos, pueden utilizarse con los métodos y reactivos corrientes de desinfección para la eliminación de virus, viroides, micoplasmas, hongos y bacterias internos y otros agentes infecciosos. Hay disponibles procedimientos especiales para desinfección de explantes, o partes de plantas que son separadas y puestas en cultivo se obtiene fácilmente tratando los órganos o secciones donantes con soluciones de hipocloritos (blanqueadores basándose en sodio o calcio). Las preparaciones antisépticas comerciales, son menos efectivas, con la excepción quizá del peróxido de hidrógeno, y los alcoholes. Los medios de cultivos se introducen en un autoclave por cinco minutos para esterilizarlos, a una presión de 1.05 kilogramos por centímetro cuadrado. Para prevenir reinfecciones, la subdivisión de tejidos y la transferencia de tejidos, desde y hacia los medios de cultivos se realizara en cámaras protegidas, comúnmente una campana de flujo laminar. Los recipientes de cultivo tienen cierres para excluir el polvo, las esporas de hongos y otros contaminantes aéreos. Los cultivos son inoculados en cuartos ó cámaras limpias (14).

4.6.2. MEDIOS NUTRITIVOS

Los medios de cultivo, empleados para los tejidos aislados de plantas, tienen diversas composiciones y se emplean como líquidos o geles. Los constituyentes básicos incluyen todos los elementos minerales esenciales para el desarrollo de la planta; azúcar, usualmente sacarosa o algunas veces glucosa, una o más vitaminas del grupo B; tiamina, ácido nicotínico y piridoxina, inositol y agua por lo menos destilada.

El desarrollo de los cultivos lo determinan el suplemento de hormonas, particularmente auxina y citocinina. El agente tradicionalmente utilizado para la preparación de los medios sólidos (gel) el agar (14).

4.6.3 AMBIENTE DE INCUBACION

La iluminación se suple con lámparas fluorescentes que emiten mayormente en las regiones de luz azul y roja con fotoperiodos e intensidades que satisfagan las demandas de las especies en desarrollo. Las condiciones de temperatura deben igualmente llenar las necesidades de las especies y el desarrollo, aún cuando la práctica más común ha sido simular las condiciones del día y la noche que se encuentra en su hábitat natural. Irónicamente, las precauciones tomadas para evitar la reinfección es por ejemplo el sellado cuidadoso de los recipientes de cultivo; privan a los cultivos de un intercambio gaseoso adecuado. El suministro de oxígeno *in vitro*, disminuye durante el desarrollo del cultivo (14).

4.6.3.A. EFECTO DE LA LUZ

En teoría, la célula, tejidos u órganos cultivados *in vitro*; no realizan la fotosíntesis a una intensidad normal por la interrupción del intercambio CO_2 ; sin embargo, disponen de una fuente de energía que es el azúcar, presente en el medio. La tasa fotosintética va a depender del tipo y tamaño del explante utilizado. La luz es necesaria para estimular ciertos procesos morfogénicos y también para la formación de clorofila. La activación de los pigmentos; clorofila A y clorofila B ocurre a una absorbancia que va de la región azul al rojo del espectro; encontrándose entre dichas regiones, se aumenta la morfogénesis.

Para cubrir los requerimientos de luz, se utilizan lamparas de luz blanca fluorescente, con intensidades que varían de 1,000-5,000 lux. Murashige, considera que las plantas con requerimiento de fotoperíodo normal, pueden manifestar éstas necesidades *in vitro*, siendo necesario un período de obscuridad para la diferenciación de órganos. Se ha hecho costumbre mantener los cultivos con un fotoperíodo de 16 horas luz, por 8 horas de obscuridad para la inducción de brotes y raíces adventicias (14).

4.6.3.B. EFECTO DE LA TEMPERATURA

La temperatura controla los procesos de crecimiento y desarrollo celular; influye en las necesidades nutricionales del material vegetal *in vitro*, manteniendo las actividades metabólicas a un nivel normal. El intervalo de temperatura en el cual las plantas se desarrollan normalmente, varía con la especie y genotipo, sin embargo para el cultivo *in vitro*, la temperatura en el cuarto de crecimiento, se mantiene en 25 °C más o menos un grado, no obstante, se tiene que tomar en cuenta los requerimientos estacionales de algunas especies (13).

4.7. APLICACIONES AGRICOLAS

La aplicación rentable del cultivo de tejidos vegetales puede ser determinada de acuerdo a los siguientes cuatro objetivos: 1) propagación clonal rápida, 2) eliminación de patógenos, 3) desarrollo de cultivares superiores y 4) producción de fitoquímicos (13, 24).

4.8. ASPECTOS GENERALES DE LA REGENERACION IN VITRO

Al hablar de regeneración, se tienen que considerar algunos aspectos fundamentales relacionados con la teoría celular, referidos principalmente a la totipotencialidad de las células vegetales. La organización estructural de cada órgano o tejido en particular, es un efecto de la información genética contenida en cada célula del tejido y cada una de esa célula es capaz de expresar su potencialidad genética para regenerar una planta completa.

La propagación *in vitro*, micropropagación o cultivo de tejidos vegetales, consiste en el cultivo *in vitro* de las partes de una planta que pueden ser células, protoplastos o tejidos especializados (denominados explantes), bajo condiciones asépticas en un medio nutritivo adecuado y ambiente controlado (7).

4.9. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CULTIVO IN VITRO

En los estudios realizados sobre organogénesis, se ha establecido que el éxito depende de tres factores fundamentales que son: la composición química y las características físicas del medio de cultivo, control del ambiente de cultivo y la elección del explante (7).

4.9.1. COMPOSICION QUIMICA DEL MEDIO

Los compuestos esenciales son clasificados en cinco grupos: sales minerales, vitaminas, azúcares, reguladores de crecimiento y otros compuestos orgánicos (7).

4.9.2. SALES MINERALES

Utilizadas para suplir los requerimientos de macronutrientes y micronutrientes deben ser de una gran pureza o grado reactivo. Esta mezcla de sales minerales es considerada como medio básico, ya que su composición siempre va a permanecer constante (7).

4.9.3. VITAMINAS

Tienen un papel muy importante dentro del sistema enzimático actuando como coenzimas en los diferentes procesos fisiológicos de la planta. Solamente la tiamina es considerada como esencial, mientras otras como el ácido nicotínico y piridoxina son agregados para estimular procesos específicos (7).

4.9.4. CARBOHIDRATOS

En el cultivo *in vitro* el CO₂ es suplido en todo el ciclo de desarrollo por una fuente de carbono orgánica o carbohidratos. Todos los medios de cultivo requieren la presencia de azúcar en mayor o menor cantidad, por el hecho de que los explantes *in vitro*, son inducidos a desarrollarse heterotróficamente al inducirlos en un microambiente donde se interrumpe significativamente el intercambio y disponibilidad del CO₂; necesariamente para el desarrollo normal de la fotosíntesis, disminuyendo ésta, hasta casi desaparecer.

Los carbohidratos aparentemente tienen un papel biofísico y bioquímico en la formación de brotes, encontrándose que existe una acumulación de almidón antes de la formación de brotes. La sacarosa es la que se ha utilizado con mayor frecuencia debido a que se han obtenido los mejores resultados sobre otros azúcares como la glucosa, fructuosa, maltosa, etc. (7).

4.9.5 REGULADORES DE CRECIMIENTO

Cuando los explantes (células, tejidos u órganos) son aislados de la planta madre para cultivarlos *in vitro*, es necesario suministrar todo los compuestos que se encuentran en cantidades limitadas. Entre estos se encuentran las hormonas o reguladores de crecimiento, los cuales se clasifican en tres tipos: auxinas, citocininas y giberelinas, donde los dos primeros tienen especial importancia en el medio de cultivo vegetales.

Skoog y Miller; Citados por Brown y Thorpe, concluyeron que las interacciones cuantitativas entre reguladores de crecimiento; especialmente auxinas y citocininas, proporcionan un mecanismo, incluyendo la formación de órganos. Es decir, una alta concentración de citocininas suprime la formación de raíces e incrementa la producción de brotes en callos de tabaco; y por el contrario, una alta concentración de auxinas favorece la formación de raíz e inhibe el desarrollo de brotes (7).

6.9.5.A. AUXINAS

El término auxina (del griego auxein, incremento), fue utilizado por primera vez por Fritz Went, quien, como estudiante graduado en los Países Bajos en 1926, descubrió, que era posible que un compuesto no identificado causara la curvatura de coleótilos de avena hacia la luz. Este fenómeno de curvatura es denominado fototropismo. La demostración crítica fue una sustancia presente en las puntas y podía difundirse de éstas hasta una placa delgada de agar. La actividad de esta auxina se detectó mediante la curvatura del coleótilo causada por la facilitación de la elongación en el lado donde se colocó placa de agar.

Ciertos compuestos que sólo sintetizan los químicos también causan muchas respuestas fisiológicas comunes al ácido indolacético (IAA), en general se les considera auxina. De ellos el que más nos interesa es el ácido naftalenacético (ANA). Como no son sintetizados por plantas, no son hormonas. Se les clasifica como reguladores del crecimiento vegetal (7, 14, 20, 26).

4.9.5.A.a. TRANSPORTE DE LA AUXINA

En contraste con el movimiento de azúcares, iones y algunos otros solutos, el ANA no suele translocarse a través de los tubos cribosos del floema o por el xilema, sino principalmente a través de células parenquimatosas que se encuentran en contacto con haces vasculares.

El transporte tienen características que difieren de las del transporte en el floema. En primer lugar, el movimiento de auxinas es lento, de solo 1 cm. h⁻¹ en raíces y tallos, aunque es 10 veces más rápido de lo que podría esperarse por difusión. En segundo lugar, el transporte de auxinas es polar; en tallos siempre se presenta de manera preferencial en sentido basipédo (hacia la base), sin importar si la base está abajo como es normal o si la planta se invierte. El transporte en las raíces también es polar pero de preferencia en sentido acropétalo (hacia los ápices). En tercer lugar, el movimiento de la auxina requiere energía metabólica como lo evidencia la capacidad que tienen para bloquearlo los inhibidores de la síntesis del ATP o la carencia de oxígeno.

¿Cómo puede efectuarse el transporte polar de auxinas? La hipótesis más popular indica, en primer lugar, que las células utilizan ATPasa de la membrana plasmática para bombear H⁺ del citosol a las paredes celulares. El pH de las paredes celulares (alrededor de 5) mantiene al grupo carboxilo de una auxina menos disociada que en el citosol, en donde el pH es superior.

El transporte polar a través de un órgano requiere que la auxina salga sólo por el extremo basal de una célula opuesto por donde entró. Esta salida preferencial por el extremo basal supone que algunos portadores situados en esta región de la membrana extraen auxinas cargadas hacia la pared celular, donde de nuevo el pH provoca que la mayor parte de ellas se vuelvan moléculas sin carga (20).

4.9.5.A.b. EFECTO DE LAS AUXINAS SOBRE LAS RAICES Y LA FORMACION DE RAICES

El ANA existe en raíces a concentraciones similares a las que se encuentran en muchas otras partes vegetales. La administración de auxinas promoverá la elongación de secciones escindidas de raíces o aún de raíces intactas de muchas especies, pero sólo a concentraciones extremadamente bajas (10⁻¹⁰ a 10⁻¹² M. dependiendo de la especie y la edad de las raíces).

La suposición es que las células radicales suelen contener auxina suficiente o casi suficiente para la elongación normal. Ciertamente, muchas raíces extirpadas crecen durante días o semanas *in vitro* sin necesidad de esta hormona. Una de muchas preguntas acerca del mecanismo de acción de las auxinas tienen que ver con la manera en que pueden inhibir el crecimiento de la raíz a concentraciones micromolares.

Desde hace mucho se ha supuesto que parte de esta inhibición se debe al etileno, ya que las auxinas de todos los tipos estimulan la producción de etileno en muchos tipos de células vegetales, en especial cuando se agregan cantidades relativas elevadas de auxinas. En la mayoría de las especies el etileno retarda la elongación tanto en raíces como en tallos.

La capacidad de las raíces escindidas de crecer en cultivos de tejidos durante semanas o meses, significa que tales raíces no dependen de ninguna auxina para producirla en el sistema aéreo. Esto puede significar que, las raíces se adaptan tanto para formar la o las auxinas que necesitan. También puede significar que, las raíces siempre tienen la capacidad de sintetizar auxinas suficientes para su crecimiento.

La eliminación de yemas y hojas jóvenes, ambos ricos en auxinas, inhibe el número de raíces laterales formadas. La sustitución de auxinas por estos órganos con frecuencia resiste la capacidad de la planta para formar raíces. Así, hay una diferencia importante en los efectos de las auxinas exógenas sobre la elongación de la raíz en donde lo usual es observar una inhibición, y en la iniciación de la raíz y el desarrollo temprano, en donde se observan una promoción. La auxina sintética ANA por lo común es más eficaz que el IIA, al parecer debido a que no es destruida por la IAA oxidasa u otras enzimas y, por consiguiente, persiste por mayor tiempo (20).

4.9.5.A.c. POSIBLES MECANISMOS DE ACCION DE LAS AUXINAS

En el crecimiento inducido por las auxinas, el potencial hídrico se mantiene no sólo más negativo que el de la solución circundante, sino también más negativa que las secciones de control. Esto se debe a que las paredes celulares de células tratadas con auxinas ceden con mayor facilidad, de modo que el potencial de presión que requiere para forzar la expansión celular de estas células nunca tiene que volverse tan elevado como células no tratadas. La conclusión que se obtiene de muchas investigaciones que se han realizado es que las auxinas provocan un ablandamiento o aflojamiento de la pared, término que describe la naturaleza más rápidamente extensible o plástica de las paredes de células tratadas con auxinas (20).

4.9.5.B. CITOCININAS

Hacia 1913, Gottieg Haberlandt, en Austria, descubrió que un compuesto desconocido presente en los tejidos vasculares de diversas plantas estimulaba la división celular que causa la formación del cambium del corcho y la cicatrización de las heridas en tubérculos cortados de papa. En la actualidad conocidas como citocininas, que estimulan la citocinesis, pero la definición razonable debe depender en parte de los primeros descubrimientos de que las citocininas promueven la citocinesis (división celular) en tejidos cultivados in vitro, como los cultivos de médula de tabaco, floema de zanahoria o tallos de soya. De hecho, R. Horgan (1984) las definió como sustancias que, en presencia de concentraciones óptimas de auxinas, inducen división celular en la médula de tabaco o algún sistema de ensayo similar desarrollado en un medio definido optimo. (7, 14, 20, 26)

4.9.5.B.a. METABOLISMO DE LAS CITOCININAS

Las concentraciones celulares de citocininas también son influidas por su degradación y por su conversión en derivados probablemente inactivos, diferentes de los nucleótidos. La degradación es efectuada principalmente por la citocinasa oxidasa, un sistema enzimático que extrae la cadena lateral de cinco carbonos y libera adedina (o bien adenosina libre, cuando se oxida el ribósido de zeatina). La formación de los derivados de citocinina es más compleja debido a que se pueden formar muchos conjugados (Letham y Palni, 1983). Los conjugados más comunes contienen ya sea glucosa o alamina; a los que contienen glucosa se les llama glucósidos de citocinina (20).

4.9.5.B.b. SITIOS DE SINTESIS Y TRANSPORTE DE CITOCININAS

En general, los niveles de citocininas son máximos en órganos jóvenes (semillas, frutos y hojas) y en las puntas de las raíces. Parece lógico que se sinteticen en esos órganos, pero en la mayoría de los casos no podemos desechar la posibilidad de su transporte desde otro lugar. Para las puntas de las raíces, casi con seguridad interviene la síntesis; por lo que si las raíces se cortan en forma horizontal, exudan citocininas (debido a la presión de raíz), desde el xilema de las partes inferiores restantes por periodos hasta de cuatro días.

El transporte de varios tipos de citocininas ciertamente se realiza en el xilema, pero los tubos cribosos también contienen citocininas, como lo demuestra la presencia de éstas en la mielecilla de los áfidos. Los experimentos con hojas desprendidas de dicotiledóneas dan más evidencia del transporte en el floema (20).

4.9.5.B.c. DIVISION CELULAR Y FORMACION DE ORGANOS PROMOVIDOS POR CITOCINAS

Skoog y sus colegas encontraron también que, si se mantiene una relación alta de citocininas- auxinas, se producen células meristemáticas en el callo; estas células se dividen y generan otras que se desarrollan para formar yemas, tallos y hojas. Pero, si se reduce la relación de citocininas a auxinas, se favorece la formación de raíces. Seleccionando la relación adecuada, se puede hacer que los callos de muchas especies, sobre todo dicotiledóneas, se desarrollen hasta formar una nueva planta completa. La capacidad de los callos de generar plantas con resistencia a sequía, estrés salino, patógenos y determinados herbicidas o con otras características útiles.

El modo en que un callo forma una planta nueva es variable. A menudo, con relaciones de citocininas a auxinas variablemente altas, se desarrolla sólo un sistema aéreo al principio; después se forman raíces adventicias espontáneamente de los tallos, mientras todavía están en el callo. Mediante técnicas hortícolas comunes también es posible inducir a las raíces a formar tallos a partir de partes aérea o raíces adventicias o ambas, a partir del callo llamado organogénesis. A veces, los callos se hacen embriogénesis y forman un embrión que se transforma en una raíz y un sistema aéreo, ésto se conoce como embriogénesis. Suele ser necesario agregar tanto citocininas como auxinas, al medio para que se presente la embriogénesis (20).

4.9.5.B.d. EFECTO DE LAS CITOCININAS SOBRE TALLOS Y RAICES

Se piensa que para el crecimiento normal de tallos y raíces se necesitan citocininas y auxinas, pero las cantidades endógenas rara vez son limitantes. Como resultado, la aplicación de citocininas exógenas no contribuye al crecimiento de la hoja a partir de plantas sin raíz.

El método para determinar la importancia de las citocininas normal de tallos y raíces es cortar secciones y hacerlas crecer *in vitro*; en tales experimentos, la hipótesis es que las citocininas de las secciones cortadas se agotarán cuando estas se separen de las puntas de tallo o de la raíz, que se supone representan fuentes de hormonas. Sin embargo, nadie ha podido demostrar todavía, mediante mediciones reales, que en las secciones cortadas se agotarán las citocininas. Cuando se hacen crecer secciones de raíz o tallo *in vitro* una citocinina exógena, casi siempre se retarda la elongación respecto a las secciones de testigo.

Es interesante el hecho de que, si bien se inhibe el alargamiento, las secciones de tallo en general se hacen más gruesas por expansión radial de las células, de modo que el peso fresco global de las secciones tratadas no es muy diferente del de las secciones del testigo. ¿Que podemos concluir de resultados que sólo muestran inhibición del alargamiento? Podríamos decir que los tallos y raíces en elongación no necesitan citocininas. O que también, aunque esos órganos podrían necesitar las hormonas para el alargamiento, pueden ya contener en cantidades suficientes (20).

4.9.5.B.e. MECANISMO DE ACCION DE LAS CITOCININAS

La variabilidad de los efectos de las citocininas, sugiere que ésta puede tener distintos mecanismos de acción en distintos tejidos; sin embargo, lo más sencillo sería que un efecto primario común fuera seguido por numerosos secundarios que dependieran del estado fisiológico de las células blanco. Como en el caso de otras hormonas, debe ocurrir amplificación del efecto inicial, por que las citocininas están presentes en bajísimas concentraciones (0.01 a 1.0 μM). Desde hace mucho se sospechaba un efecto promotor de las citocininas sobre la información de RNA y enzimas, en parte porque los efectos de las citocininas normalmente son bloqueados por inhibidores de las síntesis de RNA o proteínas. No se han observado efectos específicos sobre la síntesis de DNA, aunque citocininas exógenas con frecuencia incrementan la división celular y podrían necesitar normalmente para ese proceso.

La promoción de la citocinesis es una de las respuestas más importante de la citocininas porque permite la micropropagación comercial de varias cosechas de cultivos de tejidos (20).

4.10. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA MICROPROPAGACION

Algunas de las ventajas de las técnicas de micropropagación *in vitro* son que, mediante esta metodología, se puede obtener altas tasas de multiplicación. A partir de un embrión (explante inicial) es posible lograr en el lapso de un año, varios centenares de plantas que son fuente de semilla más sana, libre de nemátodos, hongos y bacterias en comparación con aquellas obtenidas por medio de la propagación convencional. Es posible también, aunque no en todos los casos, la obtención de plantas libres de virus. Así mismo se facilita la conservación y el intercambio de germoplasma (Muller & Sandoval, 1986).

Por otro lado Vasil & Vasil (1980), comparando la micropropagación *in vitro* con los métodos tradicionales encontraron las siguientes ventajas de la micropropagación:

- 1- Permite tener plantas de calidad uniforme, además crecen y maduran más rápido que las propagadas tradicionalmente.
- 2- Permite la obtención de material libre de plagas y enfermedades, pudiéndose producir *vitro*-plantas durante todo el año.
- 3- Facilitan el intercambio de germoplasma en el ámbito internacional sin ningún riesgo (7, 14).

4.11. DESVENTAJAS

Berg & Bustamantes (1974), afirman que uno de los riesgos de la micropropagación *in vitro* reside propagar igualmente enfermedades de tipo vascular o sistémico (Mal de Panamá, Moko bacteriano y Virus), si el propágulo inicial está contaminado.

Las instalaciones adecuadas y equipadas con el material que se utiliza en este tipo de proyectos.

Personal capacitado para poder realiza con satisfacción las actividades que conlleva esta técnica (7).

4.12. EL EMBRION CIGOTICO EN LOS VEGETALES

En el ciclo normal de una plántula la embriogénesis (el embrión), prosigue del desarrollo de una célula totipotente o cigoto unicelular, lo cual resulta de la unión de óvulo y un grano de polen, hacia la iniciación y desarrollo de un embrión.

En las angiospermas, el ovario está contenido en las flores. En su interior hay gránulos en número variable llamados primordios seminales que encierra un saco embrionario. Cuando el tubo polínico ha penetrado hasta el micropilo, de los núcleos espermáticos o espermatozoides que lleva, fecunda al óvulo, mientras que el otro se fusiona con el núcleo secundario, proporcionando así una doble fecundación.

El óvulo fecundado origina el embrión, mientras que la otra fecundación da lugar a un tejido nutricional llamado endosperma. El primordio seminal se transforma en semilla. El embrión, en un principio, es un cuerpo redondeado y pluricelular, más tarde se diferencia en una radícula (parte que mira al micropilo), cotiledones y el punto vegetativo, quedando en estado de vida latente. El embrión normal es un eje polarizado con un meristemo apical y uno radical. Los cotiledones tienen una morfología y estructura particular sirviendo de órgano de reserva. El desarrollo del embrión sigue una secuencia bien definida: estado globular, estado corazón, estado torpedo, etc. (7).

4.13. CULTIVO DE EMBRIONES *IN VITRO*

Un cultivo de embriones se prepara mediante la remoción aséptica del embrión de la semilla, y su colocación e un medio de cultivo esterilizado para que desarrolle. Debido a que las exigencias nutritivas de un embrión en desarrollo se vuelven menos complejas a medida que se aproxima a su madurez, el medio de cultivo utilizar dependerá del estado de desarrollo del embrión. Por lo común para el cultivo de embriones el mejor resultado se obtiene con un medio de agar. Para preparar un cultivo se esteriliza la superficie del fruto con un desinfectante como ácido fénico (al 5% durante 5 minutos), alcohol, hipoclorito de calcio o de sodio o meramente se le da un lavado prolijo. Se abre el fruto cortándose si es suave y rompiéndose con un torniquete si es duro. Se extrae la semilla (óvulo) con unos fórceps estériles y se coloca en una caja petri esterilizada. Se remueven las cubiertas de la semilla o se corta y se abre el óvulo para extraer el embrión (11, 24).

4.14. MEDIO NUTRITIVO ARTIFICIAL DE CULTIVO

El material vegetativo se cultiva *in vitro* suministrándole un medio especializado. Un medio de cultivo generalmente consiste en una solución de sales la cual se compone de los elementos minerales mayores y menores necesarios para el crecimiento de plantas completas, adicionando distintas vitaminas, aminoácidos y una fuente de energía (Reinert & Yeoman, 1982).

El crecimiento y desarrollo de cultivos vegetales generalmente también dependen de la adición de reguladores de crecimiento vegetal al medio de cultivo. Los reguladores del crecimiento vegetal son compuestos que, en concentraciones muy bajas, son capaces de modificar el crecimiento induciendo morfogénesis vegetal (Thorpe, 1994) (14).

4.15. ORGANOGENESIS

La organogénesis *in vitro* es el proceso a través del cual es factible regenerar tejidos y órganos de novo. Gran cantidad de especies han sido estudiadas para conocer su capacidad organogénetica (solanáceas). Un ejemplo de totipotencia, lo constituyen la regeneración de plantas a partir de una sola célula de *Nicotiana tabacum* (14).

4.16. LA SEMILLA

Es el sitio de parcial desarrollo del nuevo esporofilo (embrión) y el lazo de unión entre generaciones sucesivas. Es además, la estructura que permite supervivencia y dispersión en diferentes condiciones ambientales; así como una subsiguiente germinación exitosa. Hay una inmensa diversidad en la estructura externa e interna de las semillas, que se relaciona en gran parte con diferentes estrategias de dispersión y germinación. Estas variaciones incluyen el tamaño y posición del endospermo y el embrión, estructura, textura y color de la cubierta seminal y forma y dimensiones de la semilla.

En la mayoría de los casos, una semilla consta de la cubierta seminal (producto de uno o ambos tegumentos del aumento seminal), el perisperma (remanente de la nucela), el endosperma (tejido resultante de la fusión entre un esperma y los núcleos polares de la célula central del saco) y el embrión (resultado de la fertilización de la célula huevo u oosfera por un esperma).

La semilla presenta un avance significativo en la evolución de las plantas superiores; la fertilización tiene lugar dentro de los tejidos protectores de la planta madre y durante su desarrollo, el embrión recibe nutrientes de ésta. En forma adicional el embrión es protegido por la cubierta seminal. Estos factores determinan el éxito y dominancia de las plantas con semilla en el ambiente terrestre. El desarrollo evolutivo de las semillas en las espermatofitas y la derivación de los mamíferos ovíparos a partir de los vertebrados productores de huevos muestran cierto paralelismo (3).

En el desarrollo de la semilla pueden identificarse tres fases, desde un punto de vista funcional. Al inicio hay una serie de divisiones celulares que dan origen a los tejidos vegetativos en la cubierta seminal y el embrión. Sin embargo en vez de continuar hacia la formación de la plántula, los cambios ontogenéticos se orientan hacia una nueva fase que tiene como objetivo garantizar el éxito de la descendencia como unidad independiente, en esta etapa se acumulan sustancias de reserva. La tercera fase se caracteriza por una drástica reducción de la actividad metabólica, acompañada de la desecación de la semilla. Durante la dispersión y antes de la germinación, el metabolismo debe permanecer inactivo; la inactividad es desencadenada por el bajo contenido de agua, la impermeabilidad de la cubierta seminal y la posible presencia de inhibidores (3).

4.16.1. CUBIERTA SEMINAL

En las semillas bitécnicas la cubierta seminal consta de la testa (tegumento externo) y tegmen (tegumento interno), cada tegumento tiene su propia abertura. Las semillas unitécnicas tienen una sola abertura (micropilo) y la cubierta seminal se llama testa. En la cubierta seminal se localiza la cicatriz funicular o hilo, que indica el punto en que el funículo y la semilla se separan.

El desarrollo de la cubierta seminal se inicia cuando se fertiliza el rudimento seminal. La cubierta seminal está constituida por los tegumentos y el tejido calazal y rafal; así, cuando la capa externa del tegumento externo se diferencia como una capa de protección mecánica (exotesta) (3).

4.16.2. ENDOSPERMA

El producto de la fusión de un núcleo espermático con los núcleos endospermáticos, que se encuentra en la célula endospermica primaria. Las células derivadas de esta célula inicial, mediante una serie de mitosis sucesivas constituyen el endosperma.

El endosperma es responsable del crecimiento y germinación del embrión: sin embargo, estudios recientes demuestran que este tejido no tiene un papel significativo en la nutrición del proembrión, ya que en esa época se encuentra en activa división celular. *Orchidaceae*, *Podostemaceae* y *Tropaceae*, carecen de endosperma. En algunas especies (leguminosas) el endosperma es digerido por completo durante la embriogénesis; esas semillas reciben el nombre de exalbuminosas y tienen, en general, un embrión grueso, carnoso, con cotiledones e hipocotilo almacenadores de sustancias de reserva (3).

4.16.3. RELACIÓN EMBRIO-ENDOSPERMA

En forma clásica se asignó al endosperma la función de nutrir al embrión; no obstante diversos estudios recientes indican la dificultad de que el endosperma ejerce influencia en la embriogénesis temprana. En *Carsella bursa-pastoris*, el endosperma se desarrolla cuando el embrión tiene forma de corazón, por lo que no puede contribuir en forma significativa a su nutrición. Durante la temprana ontogenia del embrión, el endosperma necesita nutrientes adecuados para su propia nutrición. Sin embargo, en la embriogenia tardía, el endosperma tiene numerosos materiales de reserva que son utilizadas para el desarrollo del embrión. Es muy probable que el endosperma no solo nutre al embrión sino que transporta sustancias de otras partes de la semilla. La presencia de células de transferencia en muchos endospermas, refuerza esta hipótesis. En *Phaseolus coccineus*, el complejo endosperma-suspensor parece ser la mayor vía de ingreso de nutrientes al embrión. Además de su función nutritiva, el endosperma parece tener un papel morfogénico en la regulación del desarrollo del embrión, como algunos reguladores de crecimiento fueron descubiertos en el suspensor, el complejo endosperma-suspensor podría estar involucrado en el control de la morfogénesis del embrión (3).

4.16. 4. EMBRIÓN

El huevo fertilizado o cigoto representa el inicio del embrión en las espermatofitas. El cigoto es un sistema unicelular que a través de una secuencia programada de eventos, da origen a un embrión multicelular con órganos diferenciados, que contiene en sí mismo las potencialidades de una planta adulta. En las angiospermas, el embrión se localiza en el extremo micropilar del saco embrionario, con su extremo basal unido a la pared del saco y su porción apical proyecta hacia la célula central (3).

4.16.4.A. DIFERENCIACIÓN DEL EMBRIÓN

El crecimiento tridimensional del embrión se inicia cuando las paredes verticales se depositan en la célula terminal del proembrión. Luego, mediante divisiones en varios planos, alcanza una forma globular. La diferenciación se inicia, en el proembrión globular, con el establecimiento de los loci cotiledonar y epicotiledonar en el polo del vástago; también se distinguen la región hipocotiledonar y el polo radical en la hipófisis. La región hipocotiledonar contribuye a la formación del eje embrional, mediante división y alargamiento celulares. Esta fase de crecimiento diferencial del embrión conduce al establecimiento de los meristemos y a una acentuación de las diferencias entre vástagos y raíz (3).

4.16.4.B. DESVIACIONES EMBRIOGENETICAS

En algunos taxa parásitos, saprofitos y en otros grupos (*Ranunculáceas*, *Oléasele*, *Piperáceas*, *Orchidaceae*) es común que los embriones sean reducidos (*Vanda*, *Monotropa*, *Ulticularia*, *Peperomia*, *Piper*, *Anemone*, *Ranúnculos*) o anómalos (*Paeonia*). En otros casos hay una desviación en el origen; algunos se forman por APOMIXIS (proceso asexual en donde el embrión se forma sin que ocurra la meiosis; la fusión de gametos o ambas) ya sea de una célula huevo no fertilizada (partenogénesis haploide) o de otra célula del gametófito (apogamia haploide). Si no ocurre meiosis y se forman un gametófilo diploide puede ocurrir partenogénesis diploide o apogamia diploide. El desarrollo de los embriones cultivados en medios artificiales sigue un patrón normal o anormal que depende de los factores físicos y químicos del ambiente. En el callo se forman embriones estructurales, semejantes a embriones que bajo condiciones adecuadas pueden dar origen a una planta completa. Los protoplastos aislados suelen seguir una embriogenia más parecida a la normal que los embriodes del callo (3).

A continuación se presenta un dibujo con las diferentes partes de la semilla de zarzaparrilla (Figura 3).

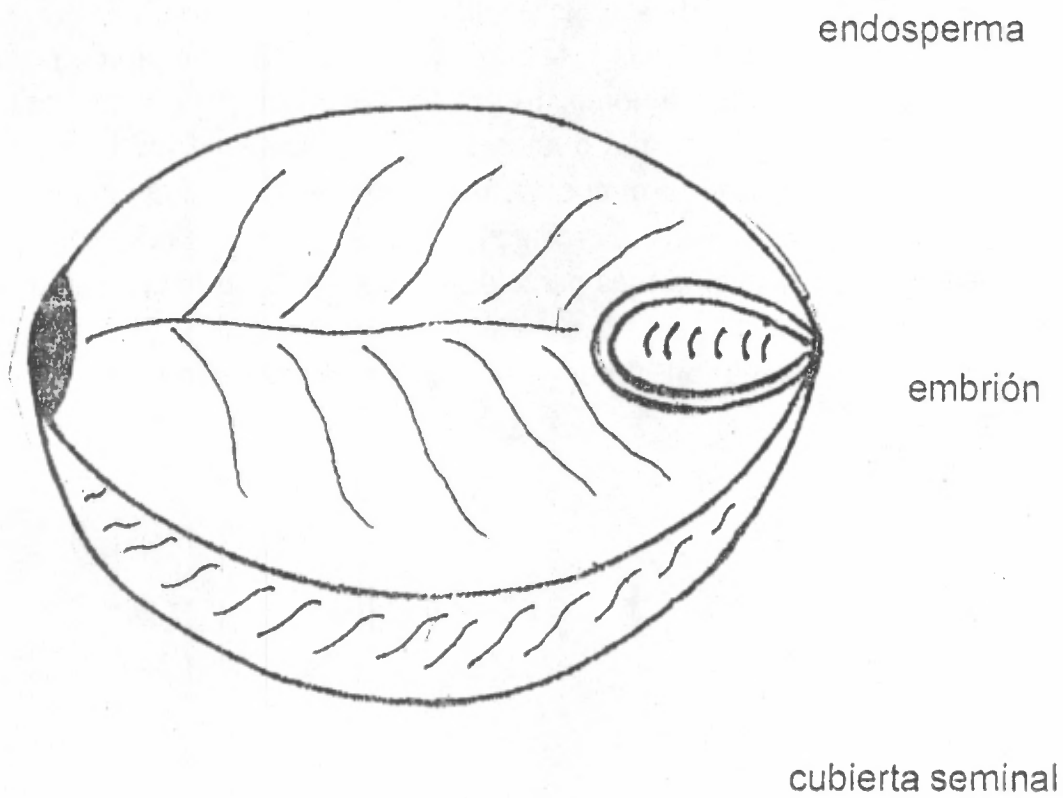


FIGURA 3. Corte longitudinal de la semilla *Smilax domingensis* Willdenow, mostrando sus diferentes partes.

FUENTE: NERY MENDOZA

5. OBJETIVOS

- 5.1. Determinar la respuesta de los embriones cigóticos de la zarzaparrilla *Smilax domingensis* Willdenow a la micropropagación.

- 5.2. Identificar el mejor tratamiento de ácido naftalenacético y bencil aminopurina para la micropropagación de embriones de zarzaparrilla *Smilax domingensis* Willdenow.

6. HIPÓTESIS

6.1 Por lo menos uno de los tratamientos de ácido naftalenacético (ANA) y bencil aminopurina (BAP) en diferentes concentraciones será el más adecuado para la obtener raíces adventicias a partir de embrión cigótico.

6.2. Por lo menos uno de los tratamientos de ácido naftalenacético (ANA) y bencil aminopurina (BAP) en diferentes concentraciones será el más adecuado para obtener brotes adventicios a partir de embrión cigótico.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. TRATAMIENTOS

Los tratamientos evaluados consisten en 16 combinaciones de reguladores de crecimiento; ácido naftalenacético (ANA) y bencil aminopurina (BAP), un medio de cultivo (MS) y un explante (embrión), más un tratamiento testigo (que diferencia la ausencia de reguladores de crecimiento). Se realizarán 10 repeticiones, lo cual suman 170 unidades experimentales. A continuación se presenta el cuadro 3, con las concentraciones de regulador de crecimiento de los tratamientos usados.

CUADRO 3. Formación hormonal de los tratamientos.

TRATAMIENTOS	BAP (mg/lt)	ANA (mg/lt)
0	0.0	0.0
1	0.1	0.01
2	0.1	0.05
3	0.1	0.10
4	0.1	0.50
5	0.5	0.01
6	0.5	0.05
7	0.5	0.10
8	0.5	0.50
9	1.0	0.01
10	1.0	0.05
11	1.0	0.10
12	1.0	0.50
13	1.5	0.01
14	1.5	0.05
15	1.5	0.10
16	1.5	0.50

7.2. UNIDAD EXPERIMENTAL

La unidad experimental esta constituida de un frasco de 125 ml de capacidad que contiene 25 ml de medio de cultivo con su debido regulador de crecimiento correspondiente y un embrión cigótico por frasco.

A continuación se presenta el cuadro 4, presenta la distribución de las unidades experimentales dentro del laboratorio.

CUADRO 4. Distribución de cada unidad experimental en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Facultad de Agronomía, de acuerdo con los 16 tratamientos y el testigo con sus 10 repeticiones.

R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
T2	T4	T8	T16	T10	T4	T6	T14	T3	T9
T5	T16	T13	T14	T5	T8	T4	T9	T7	T3
T7	T8	T6	T15	T12	T7	T14	T4	T13	T7
T12	T2	T0	T6	T2	T14	T8	T1	T11	T13
T0	T7	T4	T11	T8	T10	T9	T13	T9	T0
T16	T13	T2	T10	T6	T12	T0	T15	T4	T11
T10	T15	T16	T0	T16	T11	T10	T11	T10	T4
T1	T6	T7	T8	T4	T15	T2	T10	T12	T14
T8	T0	T10	T1	T7	T3	T7	T16	T5	T6
T15	T9	T3	T2	T11	T13	T3	T5	T16	T210
T3	T3	T9	T4	T13	T2	T5	T12	T15	T15
T14	T11	T15	T5	T9	T6	T16	T7	T14	T8
T9	T14	T1	T7	T0	T16	T1	T3	T1	T12
T4	T5	T11	T9	T14	T5	T12	T2	T0	T2
T11	T1	T5	T3	T1	T0	T15	T0	T2	T1
T13	T10	T12	T12	T3	T1	T11	T6	T6	T5
T6	T12	T14	T13	T15	T9	T13	T8	T8	T16

7.3. MODELO ESTADISTICO

7.3.1. MODELO COMPLETAMENTE AL AZAR

$$Y_{ij} = U + T_i + E_{ij} \quad \begin{array}{l} i = 1, 2, \dots, t \\ j = 1, 2, \dots, r \end{array}$$

donde:

Y_{ij} = Variable de respuesta de la ij-ésima unidad experimental

U = Efecto de la media general

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

E_{ij} = Efecto del error experimental asociado a la ij-ésima unidad experimental

7.3.2. MODELO FACTORIAL

$$Y_{ijk} = U + A_i + B_j + AB_{ij} + \beta_k + \epsilon_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta asociada a la ijk-ésima unidad experimental

U = Efecto de la media general

A_i = Efecto del i-ésimo nivel del factor "A"

B_j = Efecto del j-ésimo nivel del factor "B"

AB_{ij} = Interacción del i-ésimo nivel del factor "A" con el j-ésimo nivel del factor "B"

β_k = Efecto del k-ésimo bloque

ϵ_{ijk} = Error experimental asociado a la ijk-ésima unidad

7.4. COMPARACION DE MEDIAS (TUKEY)

procedimiento:

$$W = q(p, \text{glec. } \sigma) * S_x$$

$$S_x = \frac{\text{CME}}{r}$$

donde:

q = valor que aparece en la tabla de Tukey

glec = grados de libertad del error

p = número de tratamientos

S_x = error estándar de la media

r = número de repeticiones

σ = nivel de significancia

7.5. EQUIPO Y CRISTALERÍA

El equipo que se usó en este ensayo es el siguiente: autoclave, frascos de vidrio, pinzas, papel de aluminio, alicate (quebrar las semillas), cristalería en general y reactivos diversos, cámara de flujo laminar.

7.6. SELECCIÓN DEL MATERIAL EXPERIMENTAL

El material que se utilizó para la micropropagación *in vitro* fueron embriones de semilla de una sola planta ginoica (especie dioica) de *Smilax domingensis* Willdenow, provenientes de la parcela "El Cacaotal" propiedad del Licenciado Armando Cáceres, que se ubica en el municipio de Samayac del Departamento de Suchitepéquez. Fue necesario desinfectar el material (las semillas) para asegurarse que estuviera libre de microorganismos contaminantes, para lo cual se procedió de la manera siguiente: Se lavaron las semillas con agua y jabón, por lo menos cinco veces, luego se colocó el material en etanol al 70 % durante dos minutos, posteriormente se trasladó a un beacker de 200 ml que contiene hipoclorito de sodio al 20 % y finalmente dentro de la cámara de flujo laminar, se enjuagó el material con agua destilada esterilizada.

7.7. DESINFECCIÓN DEL EXPLANTE (embrión)

Después de la elección del explante, el proceso de desinfección es el paso siguiente para eliminar microorganismos patógenos externos e internos. El desinfectante más utilizado para la desinfección superficial es el hipoclorito de sodio (NaOCl), encontrándose comúnmente a una concentración de 5-6 % en los blanqueadores comerciales (magia blanca, clorox). Durante un tiempo de 5-15 minutos que dura el remojo.

7.8. SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MEDIO BASAL

Se utilizó el medio de cultivo MS por Murashige y Skooge (1962) por considerarse él mas apropiado, además de ser el medio que se ha utilizado en diversos estudios, se presenta más adelante el cual determina las concentraciones de elementos que son parte de este medio de cultivo.

Para la obtención del medio de cultivo, se prepararon antes las soluciones madres de concentración conocida, se tomó como base la preparación de un litro de medio de cultivo, agregando los ingredientes correspondientes para el medio basal Murashige y Skooge. Las combinaciones de reguladores de crecimiento fueron en concentraciones diferentes de acuerdo al tratamiento en que se utilizó. El pH se ajusta entre 5.7 a 5.8, si la solución se acidifica, entonces se le agrega NaOH; y si la solución se encuentra mayor del nivel requerido, entonces se le agrega Hcl, ya sea al 0.1 N ó 1N de acuerdo a la cantidad que se requiera.

Un litro de medio de cultivo se ocupó para 40 frascos a los cuales se les agregaron 25 ml de la solución. Pero se utilizaron dos reguladores de crecimiento; uno para la formación de raíces y el otro para la formación de brotes, estos medios de cultivo se prepararon en forma separada. Si un recipiente lleva 25 ml de medio de cultivo, entonces, debe agregar 12.5 ml de cada medio de cultivo con regulador de crecimiento para las raíces y el otro 12.5 ml del medio de cultivo con regulador de crecimiento para los brotes; La suma de los medios de cultivo hace

7.9 ESTERILIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Luego de preparar el medio de cultivo, se pasó a depositarlo en frascos de vidrio de 120 ml de capacidad, introducimos aproximadamente 25 ml del medio con sus respectivas combinaciones de regulador de crecimiento. Esterilizándose mediante el autoclave durante 15 minutos a 121 grados centígrados y 20 libras de presión.

7.10. REPOSO EN AGUA

El reposo en agua se realizó con el objeto de que la semilla se ablande al momento en que se extraiga el embrión. El tiempo es de aproximadamente 20 días.

7.11. SIEMBRA DEL TEJIDO EN EL MEDIO DE CULTIVO

La siembra en el medio de cultivo se realizó en la cámara de flujo laminar, la cual fue desinfectada con anterioridad a cada sesión de trabajo, para lo cual se utilizaba alcohol etílico al 70%, para la manipulación del tejido en la campana de flujo laminar se utilizaron los frascos estériles para la cual se utilizó el autoclave, agua destilada y cajas de petri, se utilizó equipo para el manipuleo del tejido: pinzas y bisturíes que fueron expuestos al mechero cada vez que se utilizaron para la manipulación de los explantes. Se utilizó un embrión por cada unidad experimental.

Anteriormente, para extraer el embrión de las semillas de zarzaparrilla se recurría a quebrar la semilla sobre una base resistente y golpeada con un instrumento que no dañara el embrión, pero que el mismo quedara libre de los tejidos endospermáticos, por lo general se usaba un utensilio de madera y buscar el embrión en un estereoscopio.

Se puso de manifiesto el ingenio al momento de mejorar este método rudimentario que tenía la desventaja de ocupar tiempo para extraer un embrión y si pensamos en sacar 170, con este método de trabajo nos hubiera llevado más de un día para cubrir todas las unidades experimentales. Utilizando un alicate normal de electricista, expuesto al autoclave para desinfectarlo, se ubica el extremo apical de la semilla en la que aparece un punto negro, que denota la presencia del embrión, se aprieta fuertemente a los costados a modo que la semilla se abra con el objeto que salga el embrión fácilmente sin ningún tipo de maltrato físico.

7.12. INCUBACIÓN DE LOS CULTIVOS

Se procedió a la siembra de explantes de embriones de zarzaparrilla *Smilax domingensis* Wildenow en el medio de cultivo Murashige & Skoog, suplementado con las respectivas combinaciones hormonales de ácido naftalenacético y bencil aminopurina, en frascos de vidrio de 125 ml de capacidad con 25 ml de medio, depositando en cada frasco un explante, realizándose en un total de 16 tratamientos más un tratamiento de testigo con 10 repeticiones, proporcionando condiciones homogéneas de temperatura, humedad y luz para poder inducir la formación de brotes. Los explantes que presenten respuesta (que germinen), son contabilizados. Los frascos fueron depositados en la incubadora del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, durante catorce semanas.

Se realizaron observaciones semanales del proceso de formación de brotes y raíces, cuando estaban completamente visibles, y se tomaron datos desde la semana cuatro, donde se tomaron datos y se realizaron apuntes en cada unidad experimental. A continuación se presenta el cuadro 5, con la composición química de los elementos que forman el medio de cultivo.

CUADRO 5. Composición del medio de cultivo basal Murashige & Skooge (MS) (1962), usada en la inducción de brotes y raíces de zarzaparrilla (*Smilax domingensis* Willdenow). Citado: ICTA, Principios Básicos del cultivo de Tejidos Vegetales.

COMPONENTES	mg/lt
MACROELEMENTOS	
NH ₄ NO ₃	1,600.00
KNO ₃	1,900.00
CaCl ₂ 2H ₂ O	440.00
KH ₂ PO ₄	170.00
MgSO ₄ 7H ₂ O	370.00
MICROELEMENTOS	
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025
ZnSO ₄ 7H ₂ O	10.60
H ₃ BO ₃	6.20
MnSO ₄ 4H ₂ O	22.30
HIERRO	
Na ₂ EDTA	37.30
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.80
VITAMINAS	
Ácido nicotínico	0.50
Piridoxina-HCL	0.50
Thiamina-HCL	0.10
Glicina	2.00
FUENTE DE CARBONO	
Sacarosa	30.00
AGENTE SOLIDIFICANTE	
Phitigel	10.00
Ph	5.7 -5.8

7.13. VARIABLES A EVALUAR

7.13.1. TIPO DE RESPUESTA DE CADA EXPLANTE

El tipo de variable es cualitativo, se midió la existencia de germinación por parte del embrión.

Se esperaba que el embrión se desarrollara satisfactoriamente en el medio que se colocó, hasta el desarrollo del embrión, que producirá brotes y luego paulatinamente plántulas. Se evaluaron y se representan por medio de porcentajes de cada tratamiento.

7.13.2. BROTES DEL EXPLANTE

Es una variable cualitativa. Las observaciones se hicieron por lo menos dos veces por semana; se vieron cambios que manifestaron los explantes al pasar el tiempo. Al final su crecimiento (tamaño); coloración (brillo), forma (rugosidad); fue descrito por medio de figuras.

7.14. ANALISIS DE DATOS

Prueba de normalidad a las variables, (Shapiro & Willcks).

Andeva, incluyendo el testigo (17 tratamientos).

Contrastes ortogonales (tratamientos versus testigo).

Andeva del factorial.

Prueba de medias de Tukey.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados numéricos no son significativos para utilizar algún diseño de análisis estadístico, originalmente se planteó un diseño completamente al azar y un diseño bifactorial, de acuerdo al bajo porcentaje de germinación que manifestó el cultivo de embrión de zarzaparrilla *in vitro*, se procedió hacer una descripción de los resultados. Los cuales tratamos de manifestar los acontecimientos y representarlos, apoyados en fotografías, diagramas de barras y dibujos.

Los diferentes tratamientos utilizados con sus concentraciones de regulador de crecimiento fueron: ácido naftalenacético (ANA) en niveles de 0.01, 0.05, 0.10 y 0.50 mg/lt. y bencil aminopurina (BAP) en niveles de 0.1, 0.5, 1.0 y 1.5 mg/lt. Periódicamente se realizaron observaciones, visualizándose diferentes respuestas a medida que el tiempo transcurría, desde la formación de tejido no diferenciado hasta la regeneración de plántulas.

8.1. GERMINACIÓN Y DESARROLLO

Los diferentes tratamientos con sus concentraciones de regulador de crecimiento no germinaron a excepción de los tratamientos que se describen en el cuadro 7 y representados en la gráfica 2.

La respuesta del explante de embrión fue variada, el tratamiento de auxina ácido naftalenacético (ANA) en el nivel 0.05 mg/lt. y la citocinina bencil aminopurina (BAP) en el nivel 0.1 mg/lt. Germinó a los 20 días después de su siembra, esta acción hizo generar excelentes expectativas de la respuesta del explante de embrión. Pero el último embrión que germinó se visualiza a los 33 días después de la siembra, las concentraciones de reguladores de crecimiento son las siguientes: auxina ácido naftalenacético 0.5 mg/lt. Y de citocinina bencil aminopurina 0.1 mg/lt. En total son siete embriones con reacción favorable.

8.2. ENVOLTURA DE EMBRIONES DESARROLLADOS

Se evaluaron otras formas de activar la germinación de los embriones, como la de privarlos de luz, asumiendo la etapa del entierro de semilla. Los embriones que desarrollaron y embriones que no se desarrollaron (uno de cada tratamiento, se tomaron al azar), se envolvieron en papel aluminio para privarlos de la fuente de luz por una semana y evaluar la reacción manifestada por los mismos.

La respuesta de los embriones desarrollados fue la pérdida del color verde oscuro que los caracterizaba a un color amarillento. La fotosíntesis fue interrumpida, ocasionando la pérdida de color. Las raíces crecieron considerablemente por la falta de luz.

Los embriones no desarrollaron, y se manifestaron indiferentes a esta fase, los cuales se mantuvieron iguales, sin ninguna reacción.

8.3. CULTIVO CON MS Y OTRAS CONCENTRACIONES DE REGULADOR DE CRECIMIENTO

Otra forma de evaluar las causas de la poco porcentaje de la germinación, fue la utilización de giberelinas y niveles más altos de auxinas y citocininas. La diferencia de los explantes de embrión cigótico de zarzaparrilla cultivados *in vitro* fue evidente: en auxinas, ácido naftalenacético con 3.0 mg/lit; citocininas, bencil aminopurina con 1.5 mg/lit y giberelinas a 1 mg/lit. El uso de las giberelinas que actúa como promotor de la germinación.

Los embriones que se mantienen en letargo desde el inicio no presentaron ningún tipo de respuesta a este medio de cultivo. Con la presencia de giberelinas se esperaba que los carbohidratos desdoblaran y fueran accesibles a los embriones y así activarlos, ya que esta hormona funciona como promotor de la germinación.

La respuesta en las plántulas de los embriones desarrollados es evidente y satisfactoria, el crecimiento acelerado y cambio al color inicial de verde oscuro que había perdido en la fase anterior de la ausencia de luz.

8.4. PORCENTAJE DE CULTIVOS SANOS

El porcentaje de cultivos sanos es elevado, mas del 98 % de las 170 unidades experimentales, únicamente 3 unidades experimentales se contaminaron en el trayecto de su elaboración hasta el momento de siembra del explante del embrión de zarzaparrilla.

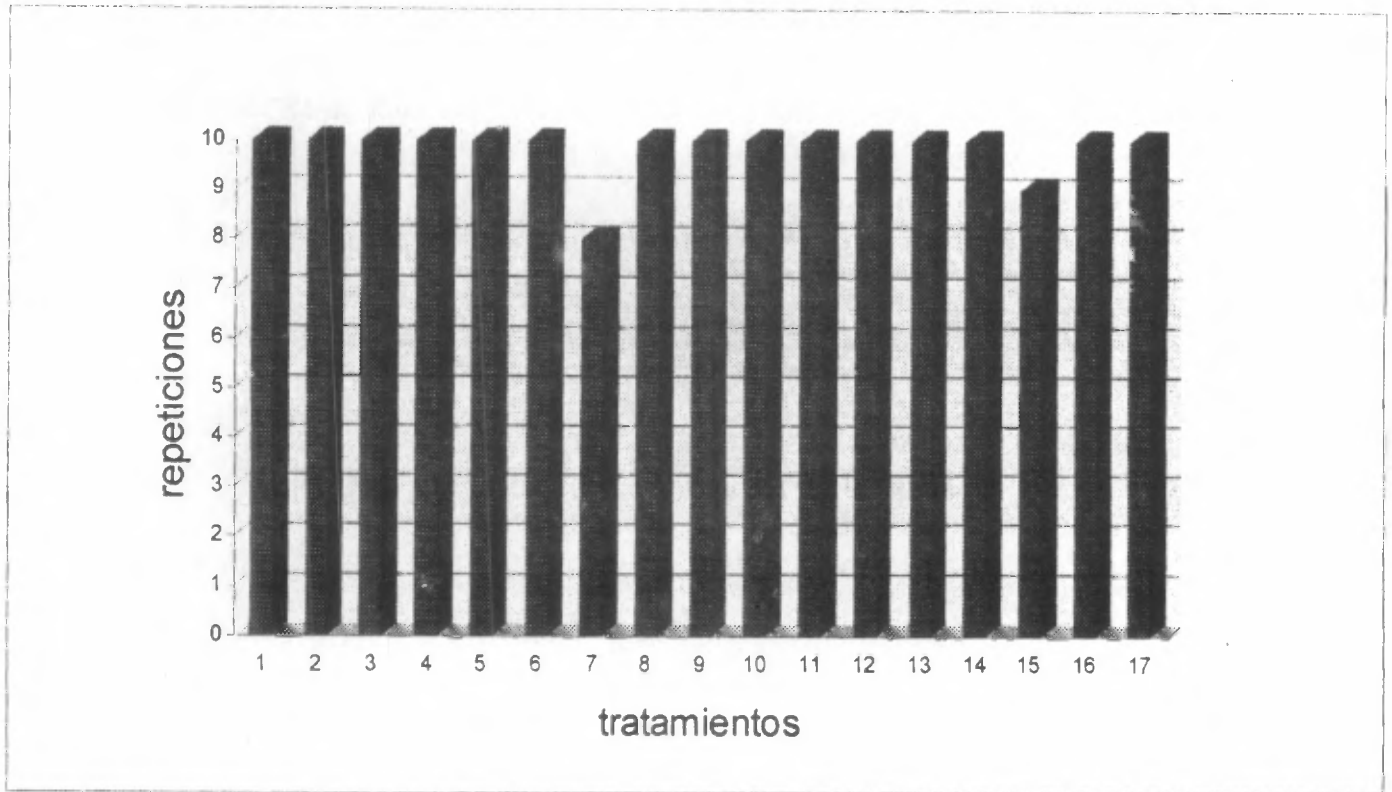
El alto porcentaje de cultivos sanos, nos respalda al momento de tomar datos y analizarlos, ya que se trabajó con diez repeticiones previendo un porcentaje grande de unidades experimentales contaminadas con microorganismos patógenos, casi 30 % de unidades experimentales contaminadas. A Continuación se presenta los tratamientos y número que padecieron de contaminación durante el proceso de siembra *in vitro* (cuadro 6).

CUADRO 6. Unidades experimentales contaminadas de cultivo *in vitro* de embriones de Zarzaparrilla.

TRATAMIENTO	mg/lt BAP	mg/lt ANA	REPETICIÓN
6	0.5	0.5	1
6	0.5	0.5	9
14	1.5	0.5	5

El bajo porcentaje de unidades experimentales contaminadas resume la calidad de los medios de cultivos que no se contaminaron, la dedicación y el esmero que se utilizaron para realizar estos cultivos se ve reflejada en el mayor porcentaje de cultivos sanos.

En la siguiente pagina se encuentra la grafica 1, que muestra el porcentaje de cultivos sanos que se obtuvieron.



GRAFICA 1. Porcentaje de unidades experimentales de cultivo sanos en la siembra de embriones de zarzaparrilla.

8.5. PORCENTAJE DE EMBRIONES GERMINADOS

El porcentaje de embriones germinados que respondieron al cultivo *in vitro* es bajo, se esperaba que rebasara el porcentaje de germinación por semilla que se mantiene entre un 16 - 20 %.¹

A continuación se presenta los tratamientos que respondieron a la micropropagación de cultivo de embriones de zarzaparrilla (cuadro 7).

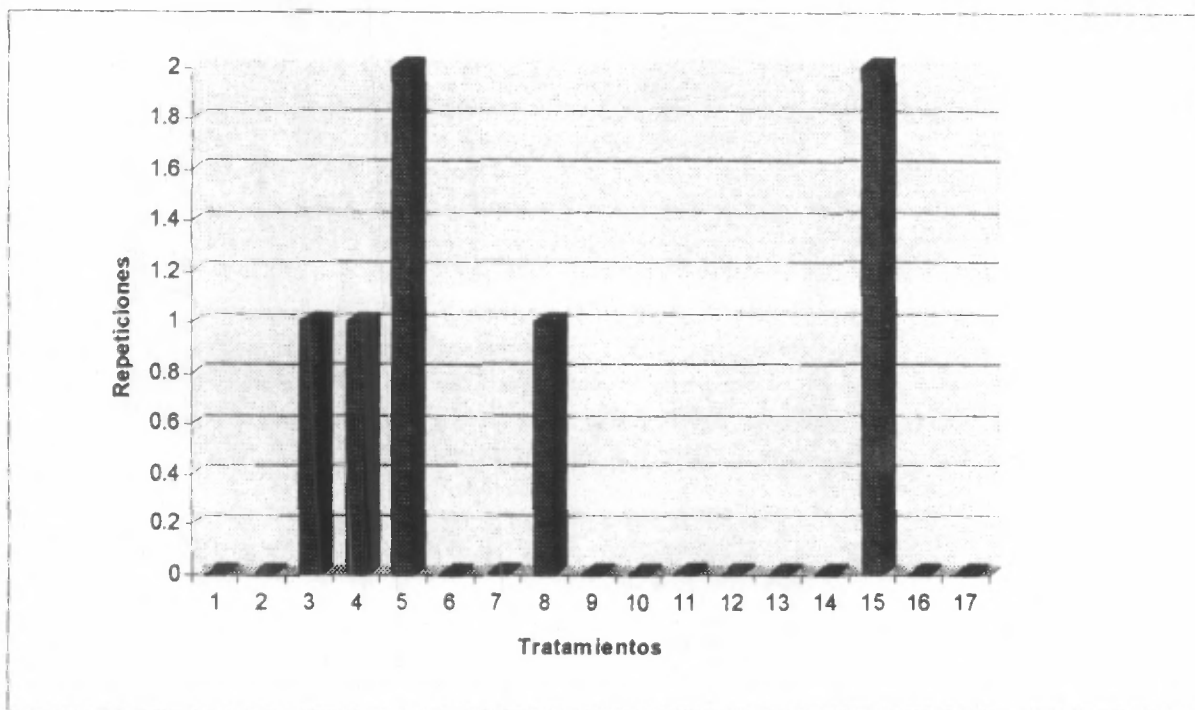
CUADRO 7. Tratamientos que respondieron al cultivo de embriones de zarzaparrilla *in vitro*.

TRATAMIENTO	mg/lt BAP	mg/lt ANA	REPETICIÓN
2	0.1	0.05	2
3	0.1	0.10	4
4	0.1	0.50	2
4	0.1	0.50	7
7	0.5	0.10	5
14	1.5	0.50	5
14	1.5	0.50	7

La mayoría de los tratamientos no respondió. El tratamiento testigo con ausencia de reguladores de crecimiento actuó de la misma manera. Según Jean Vincen Escalón en un estudio, Mejoramiento genético de las *musas sp.*, con el uso de las técnicas de cultivo de tejido y fitopatología dice: que la germinación de los embriones de musas se da a los 4-5 días cuando el embrión adquiere un color cañé, ésto indica el inicio activo de las fenoloxidasas. La germinación ocurre después de los 8-10 días después del cultivo y se manifiestan por el desarrollo de la gemula.

Comparando los embriones de musas con los embriones de zarzaparrilla, podemos pronosticar que los embriones que se mantuvieron blancos inertes nunca germinarán y se mantienen en forma de letargo fisiológico, causado por factores externos, como la temperatura, la luz, agua (estrés hídrico) ó intercambios gaseosos; ó factores internos como la genética del embrión. Más adelante se describen las posibles causas a las cuales se le atribuyen ente letargo fisiológico. A continuación se presenta la gráfica 2, conteniendo los tratamientos que respondieron a la micropropagación. En la pagina 47 se encuentran la forma en que los explantes de embrión de zarzaparrilla desarrollaron.

¹ Según el Ingeniero Vicente Martínez y el estudiante Aldo López en el trabajo de tesis del mismo, Caracterización morfológica y fenológica de una plantación de zarzaparrilla (*Smilax domingensis* Willdenow) en Samayac, Suchitepéquez.



GRAFICA 2. Número de embriones de zarzaparrilla desarrollados en el cultivo *in vitro*.

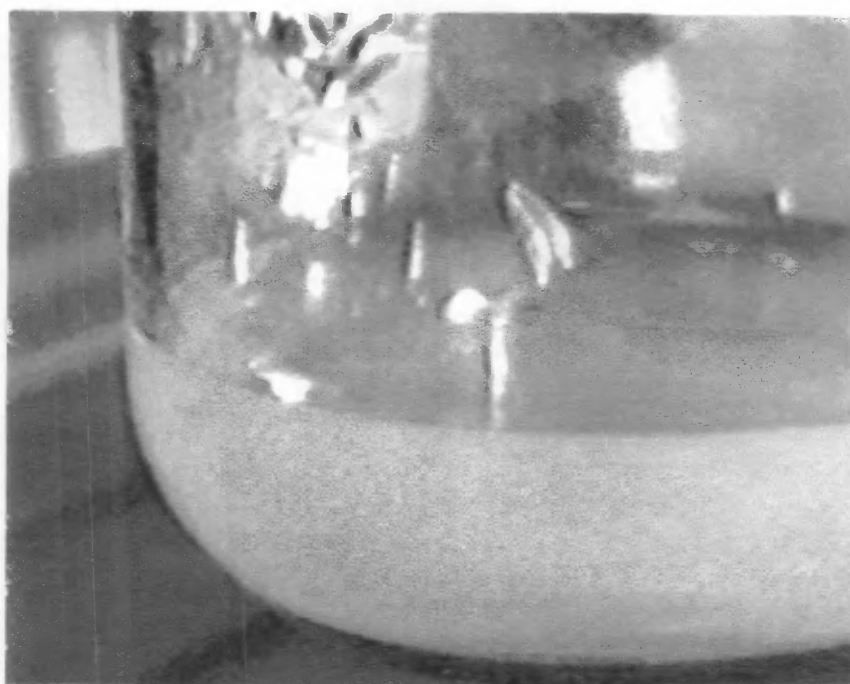


FIGURA 2 EMBRION DESARROLLADO
0.5 BAP. (Mg/lit) 0.1 ANA (Mg/lit)

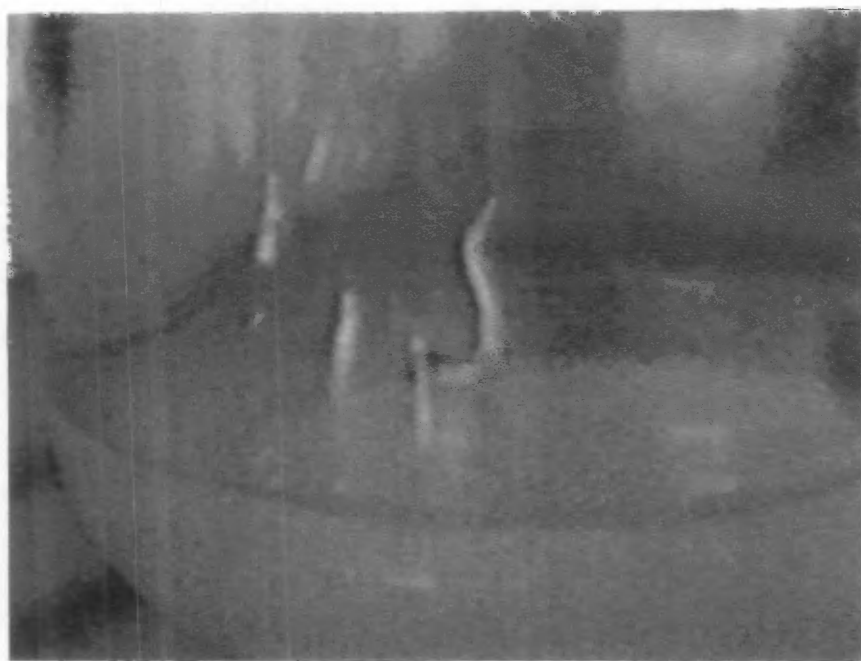


FIGURA 3 EMBRION DESARROLLADO
0.1 BAP (Mg./lit) 0.05 ANA (Mg./lit)

8.6. PORCENTAJE DE EMBRIONES MUERTOS

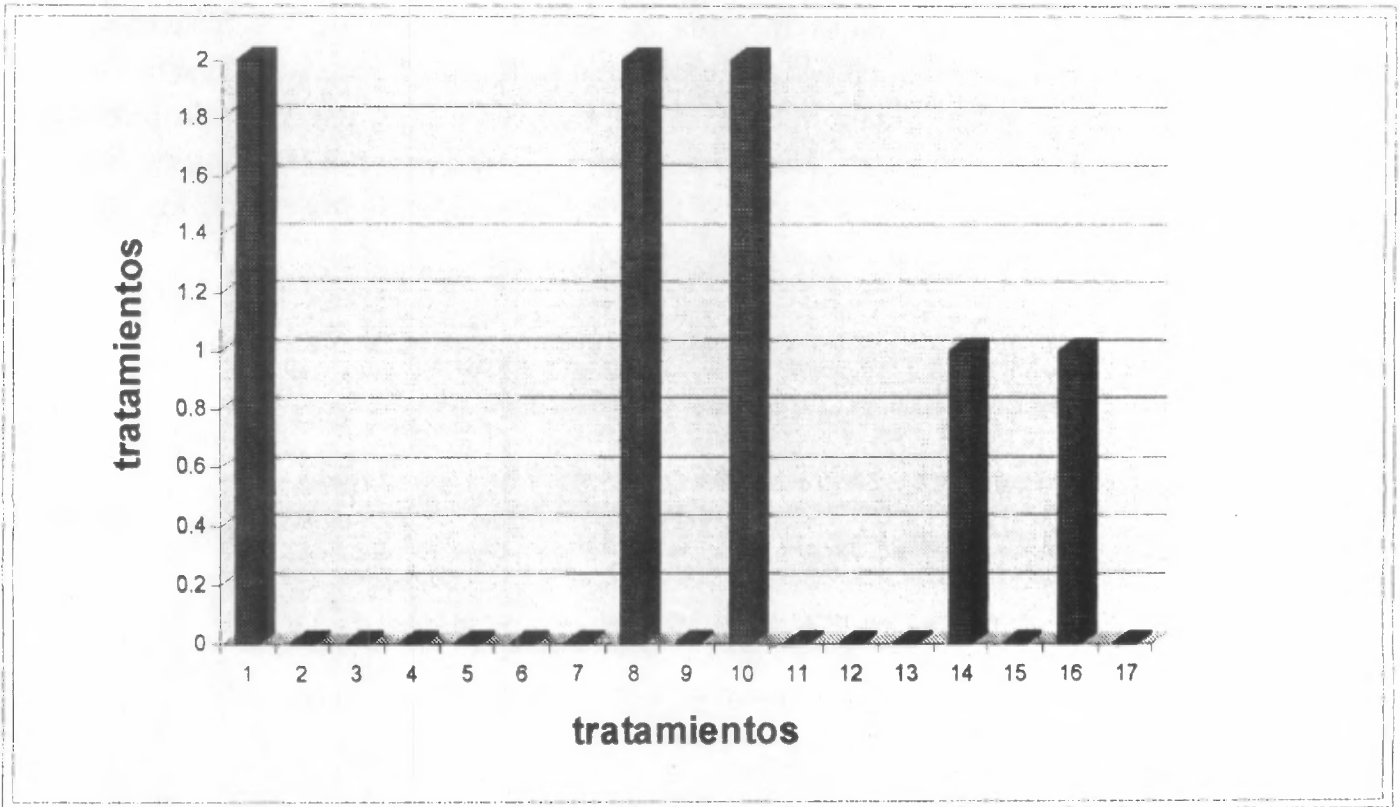
El porcentaje de embriones muertos es bajo, casi del 5 % del total de los cultivos sanos, los cuales son un porcentaje representativo como para tener una información precisa y con un alto grado de validez.

La mayoría de los embriones muertos se debe al manejo de los instrumentos del laboratorio, pinzas, alicate, asas, etc. El embrión es la parte más delicada de la semilla, que al solo utilizar una asa caliente puede quemar el embrión, en ella se encuentra la información genética para desarrollar una planta adulta, en medio del endosperma (la parte de la semilla que no interesa). A continuación se presenta los unidades experimentales con los embriones que se murieron durante el proceso de siembra (cuadro 8).

CUADRO 8. Embriones de zarzaparrilla muertos durante el proceso de siembra *in vitro*

TRATAMIENTO	mg/lt BAP	Mg/lt ANA	REPETICIÓN
0	0.00	0.00	6
0	0.00	0.00	8
7	0.5	0.10	3
7	0.5	0.10	7
9	1.0	0.01	4
9	1.0	0.01	10
13	1.5	0.01	10
15	1.5	0.10	7

A continuación se presenta la grafica 3, representando a los embriones muertos.



GRAFICA 3. Número de embriones muertos durante el proceso de cultivo *in vitro* de Zarzaparrilla.

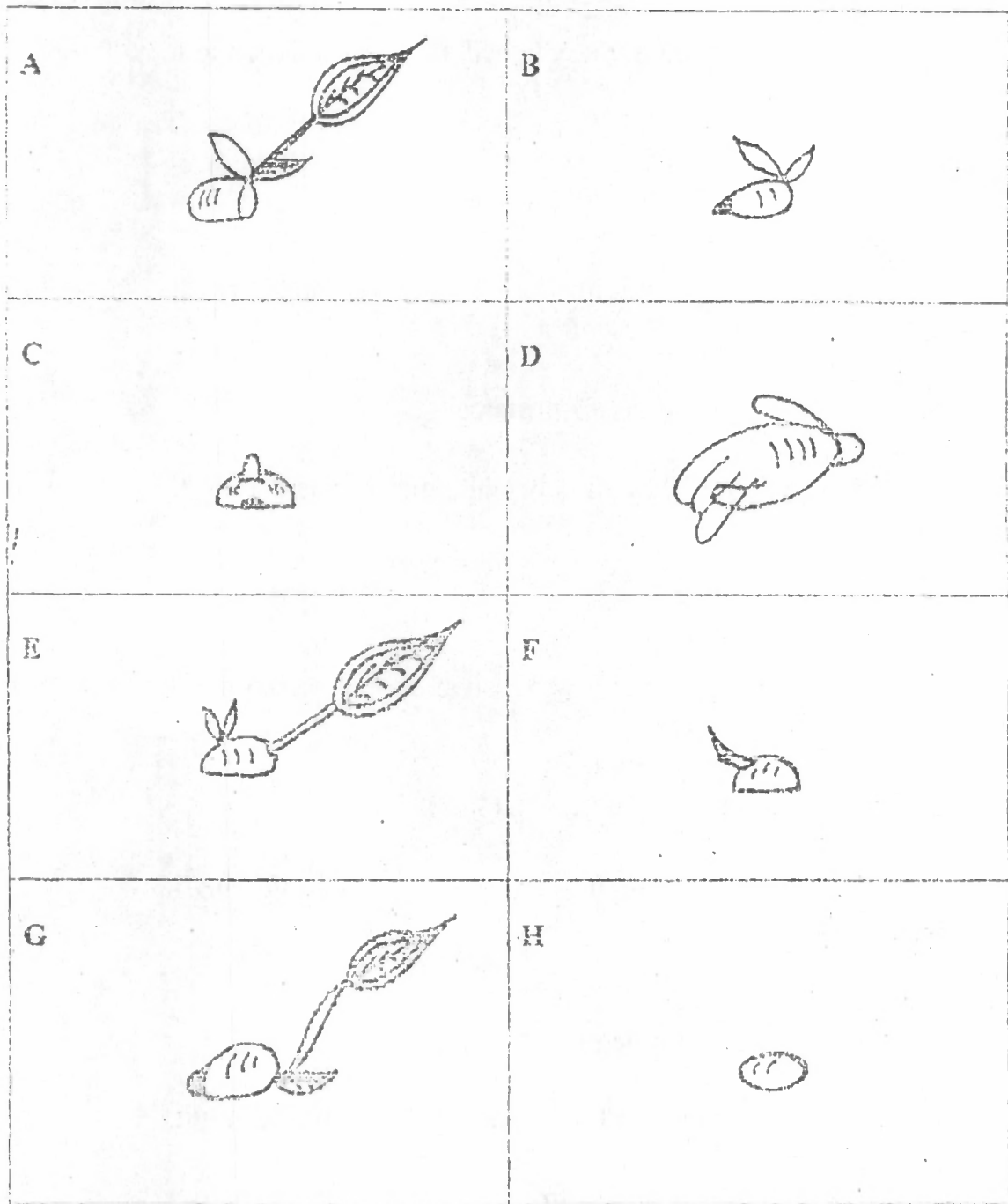


FIGURA 4
 EMBRIONES DESARROLLADOS Y EJEMPLO DE UN EMBRION EN LETARGO.

De acuerdo con las figuras que representa a los embriones de zarzaparrilla, que anteriormente se exponen, las describiremos de acuerdo como se encuentran en pleno desarrollo.

A) Con ácido naftalanacético 0.05 mg/lt. y bencil aminopurina 0.1 mg/lt.

- hoja diferenciada
- color verde claro
- parte basal blanco
- presencia de raíces

B) Con ácido naftalanacético 0.10 mg/lt. y bencil aminopurina 0.1 mg/lt.

- embrión hinchado
- color blanco (amarillento)
- parte basal negra, donde aparece la raíz principal

C) Con ácido naftalanacético 0.50 mg/lt. y bencil aminopurina 0.1 mg/lt.

- forma arrugada
- color ámbar brillante
- punto negro apical

D) Con ácido naftalanacético 0.10 mg/lt. y bencil aminopurina 0.5 mg/lt.

- crecimiento deformado arrugado
- con la base blanca, pero verde claro lo apical
- varios apéndices (5) que buscan la base, raíces

E) Con ácido naftalanacético 0.10 mg/lt. y bencil aminopurina 0.5 mg/lt.

- hoja bien desarrollada
- verde oscuro
- raíz bien definida
- apéndice blanco en la base/punto negro

F) Con ácido naftalanacético 0.05 mg/lt y bencil amino purina 1.5 mg/lt.

- apéndice foliar formándose
- formación de raíces adventicias del centro
- color verde claro

G) Con ácido naftalanacético 0.05 mg/lt. y bencil aminopurina 1.5 mg/lt.

- hoja bien formada
- verde claro brillante
- diferenciación de raíz

H) el ejemplo de un embrión que no desarrollo y se encuentra en letargo.

- color blanco pálido
- del mismo tamaño
- brillos

8.7. CONTROL AMBIENTAL DE LA GERMINACIÓN

Los factores severos en el ambiente que intervienen en la germinación: agua, oxígeno, luz, temperatura y químicos. Estos controles son aplicados para semillas que han quebrado su dormancia, como fuente, como el que nunca estuvo en dormancia.

Por ejemplo, una semilla que pase un período de tiempo expuesta al frío puede servirle para quebrar la dormancia, pero el requerimiento para germinar se ve forzado a una segunda dormancia, similar es un requerimiento de luz, semillas iluminadas con luz blanca inicial quiebra la dormancia.

De acuerdo con la clasificación del sistema Holdrige, la zona ecológica en que se encuentra la zarzaparrilla es: Bosque Muy Húmedo Subtropical (cálido), que se encuentra representada en el mapa de zonas de vida por el símbolo bmh.S (c). Esta zona de vida cubre en la Costa Sur una franja de 40 a 50 kilómetros de ancho que va desde México hasta Oratorio y Santa María Ixhuatán en Santa Rosa. Se encuentran delimitada por las Isoyetas de 3,000 y 4,000 mm. De lluvia anual, con una evapotranspiración potencial de 950 a 1,000 mm/año calculada sobre la base de la metodología.

En la mayoría de las especies se inhibe la germinación de las semillas con luz blanca, fuentes conocidas: *Nemophila insignis*, *Phacelia tamacetifolia*, *Amarantus caudata*. Semejantes semillas son normales que germinen en oscuridad. Este requerimiento frecuente de luz como inhibidor de la luz, o negativo, son semillas con fotoblastidos. Pero algunas semillas quiebran dormancia con presencia de luz.

El requerimiento de luz que necesita la zarzaparrilla, según Amador, es: al principio se recomienda que el semillero o los almácigos reciban radiación solar durante 4-5 horas/día, después de dos semanas dejan a pleno sol.

Este valor es enfatizado cuando se considera el efecto de la temperatura en la germinación, se necesita que la testa esté embebida en agua para romper la dormancia. Por ejemplo, cuando las semillas con relativa dormancia es base para que únicamente ocurra sobre una línea positiva.

La temperatura afecta la capacidad de germinar y la calidad de germinación bajo un definido rango, característica para cada especie, tienen un mínimo y un máximo de temperatura para germinar. Ocampo (1982), cita a Duke, quien menciona una temperatura promedio anual de 18 a 23 °C. de acuerdo con el instituto Meteorológico de Costa Rica, en sus mapas de temperatura, la región en donde crece la zarzaparrilla, presenta los promedios siguientes: mínimo 15 °C y máximo 30 °C, con una media de 20 °C

El estrés hídrico reduce la estimación y porcentaje de germinación, el rango es diferente entre especies desde alta sensibilidad hasta las resistentes. Las semillas tienen una ventaja ecológica, ya que si no encuentran las condiciones ecológicas adecuadas no se desarrollan y pueden establecerse como plantas en áreas en que la sequía se siente.

El estrés hídrico es usado en el laboratorio y en algunos casos se utiliza en horticultura. Para demostrar la germinación, semillas tratadas osmoticamente sometidas fuera, más los procesos de germinación. Pero cuando se les introduce agua, estas semillas casi germinan, se ve rápidamente. De modo sincronizado, se ve la emergencia de la radícula, ventajas de estos tratamientos llamados "estirados osmóticos".

La reproducción natural de la zarzaparrilla ocurre desde la planta madre florea a finales de octubre y bota la semilla a finales de diciembre, principio de enero, la semilla queda tirada en el lecho forestal, al comenzar las lluvias y las condiciones le son favorables para la semilla, entonces esta comienza a germinar, todo este tiempo la semilla ha quedado a la interperie.

El letargo, proceso mecánico fisiológico que impide el crecimiento del embrión en condiciones apropiadas. El letargo primario (innato), se origina durante la maduración de la semilla. Las causas:

- Embriones rudimentarios
- Embriones fisiológicamente inmaduros
- Resistencia mecánica o cubierta seminal
- Almacenaje insuficiente.

La semilla de *Smilax domingensis* Willdenow tiene un bajo porcentaje de germinación que va de un rango de 16 -20 % en un ambiente natural, comienza en diciembre cuando la planta madre bota la semilla hasta mayo, con las primeras lluvias de la temporada que adecúan el medio para poder germinar, y encuentra las condiciones apropiadas para su desarrollo.

De acuerdo con la posición del embrión en la semilla; embrión basal: semillas con abundante endosperma y con el embrión colocado en la base, rudimentario: pequeño, no periférico, poco diferenciado, circundado por copioso endosperma. Un ejemplo claro es la magnolia. Las semillas con embrión rudimentario producen semillas cuyos embriones son apenas algo más que un proembrión embebido en un endosperma, en época de la maduración del fruto (como en magnolia). Este tipo se presenta en las familias como *Ranunculaceae* (anémona), *Papaveraceae* (amapola) y *Araliaceae* (ginseng). También en el endospermo ocurren inhibidores químicos de germinación que se vuelven en partículas activas en temperaturas altas (8, 10).

El letargo ocurre directamente en el embrión, tenemos las condiciones adecuadas para que el embrión se desarrolle satisfactoriamente. Hasta la quinceava semana, desde el día de siembra los embriones, ninguna reacción, no están muertos, la característica del embrión muerto es que se toman negros. Como en otros cultivo de embriones de otras especies, específicamente en banano, los embriones de esta consistencia nunca germinan.

RESISTENCIA MECÁNICA: Los embriones fueron extraídos del endospermo óseo, impedimento que en cualquier momento puede causar algún tipo de impedimento de la germinación del embrión en la semilla. Descartando tipo de dormancia causado por la resistencia.

ALMACENAJE INSUFICIENTE: Desde el momento en que se extrajeron del endospermo se colocan en un medio nutritivo gelatinoso MS en el cual llena los requisitos nutricionales para un desarrollo embrionario satisfactorio, complementado con reguladores de crecimiento para sustituir las hormonas de la semilla. Este mismo medio se ha utilizado para propagar *in vitro* otras especies de zarzaparrilla (*Smilax moranensis*).

Los componentes del suelo que son parte inherente por lo general de la germinación de una semilla, hongos(micorizas), bacterias, que puedan influir de manera indirecta para la germinación y desarrollo de la semilla. En el cultivo de embriones de Loto de diferente grado de desarrollo, se utilizó un medio de cultivo MS acompañado de ácido indolacético, Kitina y Adenina teniendo muy buenos resultados, concluyendo que el embrión que se cultiva después de los 30 días después de la polinización de la planta madre se desarrolla mejor, que los que se cultivan con menos días después de la polinización (23).

La adición de hormonas en el medio de cultivo MS., es necesario para la diferenciación y desarrollo de los explantes, sin embargo estas acciones son afectadas por la presencia de la sucrosa y otros componentes del medio.(Regulation of Organ Formation by Cytokinin and Auxin in *Lilium bulboscales* Grown In Vitro, Shinsaku Takayama and Masanaru Misawa, Plant and Cell Physiology, vol. 23 No. 1 January 1982) (18).

FISIOLÓGICAMENTE INMADUROS: Cuando la semilla se trasladó al laboratorio se mantuvo el cuidado que fuera de la especie *domingensis*, que fuera de la misma planta madre para no tener variabilidad genética y estuviera en óptimas condiciones de acuerdo a su maduración, que su ciclo de maduración y abscisión se encontrara en sus últimas fases y es más, la mayoría se encontraba en el lecho de hojas que se acumulan en la base de la planta.

Se realizó un experimento alternativo para verificar la viabilidad de las semillas, con semillas de un año y semillas recientes de esta temporada, la cual no presenta diferencia en cuanto a germinación, se mantuvo el rango de germinación.

EMBRIONES RUDIMENTARIOS (dormancia genética): Por lo general la dormancia en embriones se da más a menudo en especies forestales, y algunas especies herbáceas, pero en este caso, descartando los otros factores que antecedieron a éste, el porcentaje de germinación tan bajo y la poca respuesta del embrión al cultivo *in vitro*, que se mantiene vivos (blancos), no muertos (negros). Han pasado más de quince semanas sin presentar ningún tipo de reacción por parte de la mayoría de los embriones cultivados.

9. CONCLUSIONES

9.1. Con base en los tratamientos evaluados y los resultados obtenidos, no hubo diferencia significativa entre los tratamientos, utilizando embrión cigótico.

9.2. En cinco de ellos se observó la formación de plántulas en los tratamientos: 0.1 y 0.05, 0.1 y 0.10, 0.1 y 0.50, 0.5 y 0.05, 1.5 y 0.05, en concentraciones de BAP mg/lt y ANA mg/lt respectivamente.

9.3. Los resultados de contaminación en los cultivos de embrión cigótico fue bajo (2%), lo que garantiza la confiabilidad de los resultados.

10. RECOMENDACIONES

10.1. Evaluar el comportamiento del cultivo de otras especies de zarzaparrilla, así como también otras concentraciones de auxinas y citocininas para la inducción de germinación de embriones, con el objeto de establecer un balance adecuado de dichas concentraciones de estos reguladores.

10.2. Utilizar esta investigación como un modelo para la germinación y desarrollo de embriones para producir plántulas, con base a los tratamientos que presentaron respuesta y ser tomadas como guía para la búsqueda de otros métodos o técnicas que persigan generar información para la conservación de las especies de plantas, como la zarzaparrilla que se encuentra en peligro de extinción.

9. BIBLIOGRAFÍA

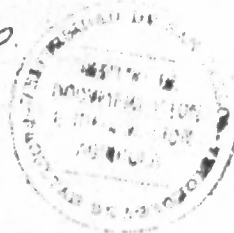
- 1) ALVAREZ CAJAS, V.M.; GONZALEZ RAMIREZ, B.H. 1998. Análisis de experimentos con el sistema SAS. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. p. 1-53

Presentado en: Foro de Estadística (2., 1998, Guatemala); Congreso Nacional de Estadística (1., 1998, Guatemala), Meeting of the International Biometric Society, Guatemala Group (1., 1998, Guatemala). Minicurso análisis de experimentos con el sistema SAS. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía, Centro de Estadística y Cálculo. s. p.
- 2) AMADOR P., D. 1995. Micropropagación y análisis de la relación taxonómica de dos especies de zarzaparrilla (*Smilax sp*), utilizando marcadores RAPDs. Tesis Mag Sc. Irapuato, Guanajuato, México, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados. 119 p.
- 3) BEWLEY, D.J.; BLACK, M. 1994. Seed, physiology of development and germination, 2 ed. New York, EE.UU., Plenum Press. 445 p.
- 4) CACERES, A.; GIRON, L.; CASTILLO, J.J. 1995. Diversidad de la flora medicinal de Guatemala. En: Congreso Nacional sobre Biodiversidad de Guatemala (1., 1995, Guatemala). Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. p.2-11.
- 5) DOMÍNGUEZ X., A.M. 1985. Métodos de investigación fitoquímica. México, Limusa. 281 p.
- 6) FLORES VINDAS, E. M. 1989. La planta, estructura y función. Costa Rica, Ed. Tecnológica de Costa Rica. 501 p.
- 7) GUATEMALA. INSTITUTO CIENCIA Y TECNOLOGIA AGRICOLAS. 1996. Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales. Guatemala. 166 p.
- 8) GUTIÉRREZ BARRERA, J. 1996. Micropropagación *in vitro* del clon de banano (*Musa sp.*) enano ecuatoriano (AAA). Tesis Ing. Agr. Managua, Nicaragua, Universidad Agraria, Facultad de Agronomía. s.p.
- 9) HERRERA, M.; MARTINEZ, V.; CÁCERES, A. s.f. Agrotecnología para el cultivo de bejuco de la vida o zarzaparrilla (*Smilax domingensis* Willdenow). Guatemala, FARMAYA. 4 p.

- 10) HILL, A.F. 1965. Botánica económica; plantas útiles y productos vegetales. Trad. Emma Gifre. Barcelona, España, Omega. 616 p.
- 11) HUDSON T., H.; DALE E., K. 1962. Propagación de plantas principios y prácticas. México., CECSA. 693 p.
- 12) IBARRA CIFUENTES, F.R. 1994. Respuesta de siete variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.) a la inducción de callo y brotes apicales, a partir de cultivos de embriones inmaduros, derivados de plantas producidas a partir de semilla irradiada con seis dosis de rayos gamma (Cesio 137). Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 67 p.
- 13) LITZ, R.E.; JARRET, R.L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos; embriogénesis somática y organogénensis, en cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones. Ed. por Luis A. Morgisski; William Roca. Colombia, CIAT. p. 104-106.
- 14) MARTINEZ A., F.de J. 1992. Regeneración *in vitro* de cuatro genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a partir de brotes de ápice. México, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía. s.p.
- 15) MUÑOZ, L.B. 1987. Plantas aromáticas y medicinales, estudio y procesado. Madrid, España, Mundi-Prensa. 305 p.
- 16) ORELLANA, A.; PERLA, H.; HERRERA, M. 1994. Estado de la domesticación de las plantas medicinales en Centro América; diagnóstico de Guatemala. En: Especies nativas, colección, diversidad biológica y desarrollo sustentable. Turrialba, Costa Rica, CATIE. p.13-21
- 17) PAHLOW, M. 1985. El gran libro de las plantas medicinales; la salud através de la fuerza curativa de la naturaleza. Trad. por J. Tola y Julia Herrera. 6. ed. León, España, Everest. 465 p.
- 18) PROYECTO DE PLANTAS MEDICINALES AGEXPRONT. (Gua). 1993. Desarrollo agrotecnológico de cinco especies medicinales silvestres, con potencial de agroexportación, *Smilax spp*, *Petiveriaalliaceae*, *Neurolaena lobata* y *Tagetes lucida*. Guatemala. 66 p.

- 19) ROQUE, J.M. 1941. Flora guatemalteca; apuntes para la materia médica de la república de Guatemala. Guatemala, Tipografía Nacional, tomo 1, p. 169-171.
- 20) SALISBURY, F.; ROSS, L.W. 1978. Fisiología vegetal. Estados Unidos, Universidad de Utha. 421 p.
- 21) SHINSAKU, T.; MASANASU, M. 1982. Regulation of organ formation by cytokinin and auxin in liliun burllscales grown in vitro. Plant And Cell Physiology (EE.UU.) 23 (1): 67-74.
- 22) STEEL, R.G. 1985. Biostedistica: principios y procedimientos. 2 ed. Mexico, Mc Graw-Hill. 622 p.
- 23) VASIL'EVA, V.E.; BATYGINA, T.B. 1981. *In vitro* cultivation of lotus embryos and ovules isolated at diferent steges of development. Soviet Plant Physiology (Rusia) 38 (2): 225-231.
- 24) VILLEGAS, L. 1989. Cultivo de tejidos vegetales aplicados a la producción agrícola. Caracas, Venezuela, Corporación Andina de Fomento. 218 p.
- 25) VOLAK, J.; STODOLA, J. 1989. Plantas medicinales. Trad. Susaeta. 2 ed. Praga, Checoslovaquia, STPN Martin. 319 p.
- 26) WEAVER, R.J. 1976. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. México, Trillas. 611 p.

Vo. Bo.
Retualla





FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGRONOMICAS

LA TESIS TITULADA: "RESPUESTA DE LA ZARZAPARRILLA (Smilax domingensis) A LA MICROPROPAGACION UTILIZANDO TEJIDO EMBRIONARIO".

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: NERY MAURICIO MENDOZA GAITAN

CARNET No: 9113747

HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Estuardo Roca Canet
Ing. Agr. Francisco J. Vásquez Vásquez
Ing. Agr. José Vicente Martínez Arévalo

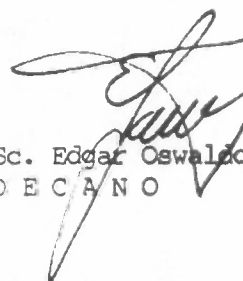
El Asesor y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha cumplido con las Normas Universitarias y Reglamentos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Ing. Agr. M.Sc. Domingo Amador Pérez
A S E S O R


Dr. Ariel Abderramán Ortiz López
DIRECTOR DEL IIA.



I M P R I M A S E


Ing. Agr. M.Sc. Edgar Oswaldo Franco Rivera
D E C A N O



cc:Control Académico
IIA.

APARTADO POSTAL 1545 § 01091 GUATEMALA, C.A.
TEL/FAX (502) 470-9794

Archivo AO/pre:mall: llusac.edu.gt § <http://www.usuc.edu.gt/facultades/agronomia.htm>