

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS**

**EFFECTO DE LA CINETINA (CIN), BENCILAMINOPURINA (BAP) Y ÁCIDO
NAFTALENACÉTICO (ANA), SOBRE LA REGENERACIÓN DE PLANTAS *IN VITRO*, A PARTIR
DE TEJIDO NO DIFERENCIADO DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)**

TESIS

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

POR

WILLIAM ROLANDO SÁNCHEZ PÉREZ

En acto de su investidura como

INGENIERO AGRONOMO

EN

**SISTEMAS DE PRODUCCION AGRÍCOLA
EN EL GRADO ACADÉMICO DE
LICENCIADO**

GUATEMALA, MAYO DEL 2001.

Dd
01
+(1970)

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

Ing. Agr. EFRAIN MEDINA GUERRA

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

**DECANO
SECRETARIO
VOCAL PRIMERO
VOCAL SEGUNDO
VOCAL TERCERO
VOCAL CUARTO
VOCAL QUINTO**

**Ing. Agr. Edgar Oswaldo Franco Rivera
Ing. Agr. Edil René Rodríguez Quezada
Ing. Agr. Walter Estuardo García Tello
Ing. Agr. Manuel de Jesús Martínez Ovalle
Ing. Agr. Alejandro Arnoldo Hernández Figueroa
Prof. Abelardo Caal Ich.
Br. José Baldomero Sandoval Arriaza**

Guatemala, Mayo del 2001

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

Distinguidos miembros:

De conformidad con las normas establecida en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de tesis titulado:

EFFECTO DE LA CINETINA (CIN), BENCILAMINOPURINA (BAP) Y ACIDO NAFTALENACETICO (ANA), SOBRE LA REGENERACIÓN DE PLANTAS *IN VITRO*, A PARTIR DE TEJIDO NO DIFERENCIADO DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)

Presentado como requisito previo a optar el título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

Esperando que la presente investigación llene los requisitos para su aprobación, me suscribo de usted.

Atentamente,



William Rolando Sánchez Pérez

ACTO QUE DEDICO

A:

DIOS

Fuente divina sobre la cual se fundamenta mi vida, luz y guía para lograr mis objetivos y metas propuestas.

MIS PADRES

Rolando Ociel Sánchez Galindo
Miriam Mirthala Pérez Méndez de Sánchez

Seres subliminales, a los cuales les debo la vida y el esfuerzo en su diario vivir para lograr mi superación. Como una pequeña recompensa a ese sacrificio.

MIS ABUELOS

José Cupertino Sánchez
Guadalupe Galindo
Antonio Pérez (+)
Madglori Méndez

Por sus sabios consejos que vierten en mi persona, para alcanzar el éxito.

MI ESPOSA

Herlinda Mireida de León Escobar de Sánchez

Como fuente de amor y ternura, fundamental en mi diario vivir. Por el esfuerzo que ambos hemos compartido para lograr nuestros objetivos.

MI FUTURO HIJO (A)

Como un ejemplo a seguir en su vida futura.

MIS HERMANOS

Claudina Guadalupe, José Wilmer, Karol Floribelly, Danitsa Bremili y Dilmar Ociel.

Por ese amor de hermanos que nos ha unido siempre ante la adversidad de la vida. Como una muestra de afecto, cariño y respeto.

MIS SOBRINOS

Jonathan y Willet.

Con amor y ternura.

MIS TÍOS

Elmo, Saby, Eva, Napoleón, Ana (+), Fátima, Lourdes, Bertha, Matilde, Etelvina y en especial a mi tío y padrino Jorge Santiago Pérez Méndez, por ser la base sobre la cual se fundamentó la carrera que hoy culmino.

Con el cariño de siempre.

MIS CUÑADOS (AS)

Darío, Letty, Pili, Milvia, Mili y Yuni.

Con especial cariño.

MIS SUEGROS

Ramiro de León y Concepción Escobar.

Cariñosamente.

PADRINOS

Rubén Estuardo Santos Lang
Elizandro Neñalí Gamboa Villagrán

Como una muestra de amistad que nos ha unido a lo largo de estos años.

MI FAMILIA EN GENERAL

Respetuosamente.

MIS AMIGOS

Manglio Aguilar, Armindo Aguilar, Miguel Aguilar, Rubelsi Ramírez, Abelardo Monjarás, Donald Osorio, Sury Pérez, Edwin Argueta, Marvin Xia, Fausto Fajardo, Erick Bolaños, Juan Carlos Bolaños, Gustavo Robles, Wenceslao Roblero, Eduardo Paz, Jaime Gonzáles, Mario Aragón, Oneida Rodríguez, Cándida Gamboa, Carlos Velásquez, Marvin Chávez, Araceli Chen, Gerson Chen, Samuel Burgos, Cristian de León, Oscar de León.

Como un recuerdo de nuestra amistad compartida.

TESIS QUE DEDICO

A:

GUATEMALA

HUEHUETENANGO

CUILCO " LA PERLA ESCONDIDA "

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMIA

INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA AGRÍCOLAS (ICTA)

INSTITUTO NORMAL PARA VARONES DE OCCIDENTE (INVO)

INSTITUTO NACIONAL DE EDUCACION BASICA, CUILCO

ESCUELA NACIONAL REGIONAL, CUILCO

A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE CONTRIBUYERON EN MI FORMACION

AGRADECIMIENTOS

A:

MIS ASESORES:

Ing. Agr. Héctor Alfredo Sagastume Mena
 Ing. Agr. Luis Gerardo Molina Monterroso
 Ing. Agr. Domingo Amador Pérez.

Por su apoyo, orientación, colaboración y entusiasmo prestado, durante la ejecución de la investigación.

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRICOLAS.

Por su apoyo y los recursos proporcionados para facilitarme el proceso de la investigación.

EL PERSONAL TÉCNICO Y ADMINISTRATIVO DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLA Y FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.

Otto Osorio, Juan Carlos Sintú, Darío Fuentes, Isidro Chen, Juan Toj, Martín Barrios, Alex Rodas, Clara Vásquez, Julieta Batres, Ing. Agr. Héctor Sagastume, Ing. Agr. Luis Molina, Ing. Químico Juan José López, Ing. Agr. Maritza García, Ing. Agr. Antonieta Alfaro, Ing. Agr. Nubuhisa Suzuki, Ing. Agr. Koichiro Kamada, Ing. Agr. Francisco Vásquez, Ing. Agr. Walter Reyes, Ing. Agr. Estuardo Roca, Ronny Romma, Esperanza de León.

Por el afecto sincero de compañerismo.

LAS FAMILIAS

Pérez Carbajal
 Burgos Mejía
 Chen Ruiz
 Gamboa Villagrán
 Santos Lang
 De León Escobar

Como una muestra de agradecimiento por el apoyo incondicional que me brindaron a lo largo de mis estudios superiores.

ABREVIATURAS

ABA	Acido abscísico
AIA	Acido indolacético
AIB	Acido indolbutírico
ADN	Acido desoxiribonucleico
ANA	Acido naftalenacético
ARN	Acido ribonucleico
BAP	Bencilaminopurina
Bo	Boro
°C	Grados centígrados
Ca	Calcio
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
CIN	Cinetina
cm	Centímetros
Cu	Cobre
DGEN	Dirección General de Energía Nuclear
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
Fe	Hierro
HCl	Acido clorhídrico
ICTA	Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas
K	Potasio
kg/ha	Kilogramos por hectárea
km	Kilómetros
Mg	Magnesio

mg/l	Miligramos por litro
ml	Mililitros
mm	Milímetros
Mn	Manganeso
Mo	Molibdeno
MS	Medio de Murashige y Skoog (1962)
mz	Manzana
P	Fósforo
pCPA	Acido clorofenoxiacético
qq/mz	Quintales por manzana
uM	Micro moles
Zn	Zinc
%	Por ciento

ÍNDICE

No. de pagina

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	3
3. JUSTIFICACIÓN.....	4
4. MARCO TEÓRICO.....	5
4.1 Marco Conceptual.....	5
4.1.1 Generalidades del Cultivo de Arroz (<u>Oryza sativa</u> L.).....	5
4.1.2 Cultivo de Tejidos.....	6
4.1.2.1 Antecedentes históricos.....	6
4.1.2.2 Importancia del cultivo de tejidos.....	8
a. Propagación acelerada.....	9
b. Ahorro y ganancia de espacio.....	9
c. Ausencia e infecciones y factores climáticos.....	9
d. Disponibilidad inmediata y permanente del material.....	9
4.1.3 Reguladores de crecimiento.....	9
4.1.3.1 Auxinas.....	11
a. Función de las auxinas.....	11
b. Mecanismo de acción de las auxinas.....	11
c. Papel de las auxinas en la formación de las raíces.....	12
d. Utilización de auxinas para estimular el enraizamiento.....	12
e. Antiauxinas.....	13
f. Efecto tóxico de las auxinas.....	14
4.1.3.2 Citocinina.....	14
a. Actividad Biológica.....	14
b. Modo de Acción.....	15
c. Efectos en el Cultivo de Tejidos.....	15
c.1 Estimulación de la División Celular.....	15
c.2 Formación de Brotes Adventicios.....	16
c.3 Embriogénesis.....	16
d. Uso en Cultivo de Brotes.....	16
d.1 Proliferación de Brotes axilares.....	16
d.2 Formación de Brotes adventicios.....	16
d.3 Inhibición de la Formación de Raíces.....	16
4.1.3.3 Biosíntesis de la Auxina.....	17
a. Vía del Ácido Indolpirúvico.....	17
b. Vía de la Triptamina.....	17
c. Vía la Indolacetoxima.....	18
d. Vía del Triptofol.....	18
4.1.3.4 Biosíntesis de las Citocininas.....	18
a. Rutas Biosintéticas.....	19
4.1.3.5 Interacción entre Auxina y Citocinina.....	20
4.1.4 Callos.....	21

4.1.5 Organogénesis.....	22
4.1.5.1 Aspectos Teóricos.....	22
4.1.5.2 Factores que Afectan la Organogénesis.....	22
4.1.5.3 Organogénesis Directa.....	23
4.1.5.4 Organogénesis Indirecta.....	23
4.1.6 Embriogénesis Somática.....	24
4.1.7 Variación Somaclonal.....	25
4.1.7.1 Causas y Manifestaciones.....	26
4.1.7.2 Potencial para el Mejoramiento de Plantas.....	27
4.1.8 Cultivo de Tejidos en Arroz.....	27
4.1.8.1 Reguladores del crecimiento.....	28
4.1.8.2 Efectos del Genotipo.....	28
4.1.8.3 Explante.....	30
4.1.8.4 Vía Morfogenética.....	30
4.1.8.5 Tipos de Células.....	31
4.1.8.6 Embriogénesis Somática en Arroz.....	31
4.1.8.7 Maduración del Embrión Somático de Arroz.....	31
4.1.8.9 Variación Somaclonal en Arroz.....	32
4.1.9 Pruebas de significancia de las diferencias entre tratamientos.....	33
4.1.9.1 Prueba de "t".....	34
4.1.10 Superficie de respuesta.....	35
4.1.10.1 Diseño de primer orden.....	35
4.1.10.2 Diseño de segundo orden.....	36
a. La superficie de respuesta cuadrática.....	36
b. Simplificación de la superficie cuadrática.....	36
c. Interpretación y experimentación adicional.....	38
4.2 MARCO REFERENCIAL.....	39
4.2.1 Ubicación del experimento.....	39
4.2.2 Variedades Evaluadas.....	39
4.2.2.1 ICTA COLOMGUA.....	39
4.2.2.2 MPI 116.....	40
4.2.2.3 LA-43.....	40
5. OBJETIVOS.....	41
5.1 GENERAL.....	41
5.2 ESPECÍFICOS.....	41
6. HIPÓTESIS.....	42
7. METODOLOGÍA.....	43
7.1 Análisis Estadístico.....	43
7.1.1 Diseño Experimental.....	43
7.1.2 Modelo Estadístico.....	44
7.1.3 Unidad experimental.....	45
7.1.4 Toma de datos de la variable de respuesta.....	45
7.1.4.1 Regeneración de plantas verdes.....	45
7.1.4.2 Número de brotes por callo.....	45
7.1.4.3 Longitud de brotes.....	45

7.1.4.4 Albinismo.....	45
7.1.5 Análisis de la Información.....	46
7.1.6 Presentación de la Información.....	46
7.2 Manejo del experimento.....	46
7.2.1 Selección de las variedades.....	46
7.2.2 Medio de Cultivo.....	46
7.2.2.1 Preparación de las Soluciones Madre.....	47
a. Sales.....	47
b. MgSO ₄	47
c. Hierro.....	47
d. Vitaminas.....	48
7.2.2.2 Preparación del Medio de Cultivo para Inducción de Callos.....	48
7.2.2.3 Preparación del Medio de Cultivo para Regeneración de Plantas.....	49
7.2.3 Trabajos en Cámara de Flujo Laminar.....	50
7.2.3.1 Desinfección de la Semilla de Arroz.....	50
7.2.3.2 Inducción de Callos de Arroz.....	50
7.2.3.3 Obtención de los Callos.....	50
7.2.3.4 Regeneración de Plantas Verdes.....	50
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
8.1 Obtención de Plantas Verdes.....	51
8.2 Plantas Albinas.....	51
8.3 Variable porcentaje de regeneración.....	52
8.4 Variable número de brotes por callo.....	54
8.5 Variable altura de brotes.....	57
8.6 Análisis tipo superficie de respuesta.....	59
8.6.1 Genotipo MPI-116.....	60
8.6.2 Genotipo COLOMGUA.....	60
8.6.3 Genotipo LA-43.....	60
9. CONCLUSIONES.....	67
10. RECOMENDACIONES.....	68
11. BIBLIOGRAFÍA.....	69
12. ANEXOS.....	72

ÍNDICE DE CUADROS

		No. de páginas
CUADRO 1.	Tratamientos y niveles de reguladores del crecimiento	43
CUADRO 2.	Cantidad de soluciones madre para preparar un litro de medio Murashige y Skoog.....	48
CUADRO 3.	Niveles aplicados de reguladores de crecimiento por variedad.....	49
CUADRO 4.	Respuesta de los reguladores del crecimiento A la regeneración de plantas verdes.....	52
CUADRO 5.	Respuesta del número de brotes según reguladores del crecimiento.....	55
CUADRO 6.	Respuesta de la altura de brotes según reguladores del crecimiento.....	58
CUADRO 7A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable regeneración de plantas verdes del genotipo MPI-116. CINETINA - ANA.....	73
CUADRO 8A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable regeneración de plantas verdes del genotipo COLOMGUA. CINETINA - ANA.....	73
CUADRO 9A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable regeneración de plantas verdes del genotipo LA-43. CINETINA - ANA.....	74
CUADRO 10A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable número de brotes por callo del genotipo MPI-116. CINETINA - ANA.....	74
CUADRO 11A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable número de brotes por callo del genotipo COLOMGUA. CINETINA - ANA.....	75

CUADRO 12A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable número de brotes por callo del genotipo LA-43. CINETINA - ANA.....	75
CUADRO 13A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable longitud de brotes del genotipo MPI-116. CINETINA - ANA.....	76
CUADRO 14A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable longitud de brotes del genotipo COLOMGUA. CINETINA - ANA.....	76
CUADRO 15A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable longitud de brotes del genotipo LA-43. CINETINA - ANA.....	77
CUADRO 16A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable regeneración de plantas verdes del genotipo MPI-116. BAP - ANA.....	77
CUADRO 17A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable regeneración de plantas verdes del genotipo COLOMGUA. BAP - ANA.....	78
CUADRO 18A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable regeneración de plantas verdes del genotipo LA-43. BAP - ANA.....	78
CUADRO 19A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable número de brotes por callo del genotipo MPI-116. BAP - ANA.....	79
CUADRO 20A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable número de brotes por callo del genotipo COLOMGUA. BAP - ANA.....	79
CUADRO 21A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable número de brotes por callo del genotipo LA-43. BAP - ANA.....	80
CUADRO 22A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable longitud de brotes del genotipo MPI-116. BAP - ANA.....	80
CUADRO 23A.	Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable longitud de brotes del genotipo COLOMGUA. BAP - ANA.....	81

CUADRO 24A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable longitud de brotes del genotipo LA-43. BAP - ANA.....	81
CUADRO 25A. Datos obtenidos por tratamientos, repeticiones Genotipos y variables de respuesta para CIN - ANA.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

	No. de páginas
FIGURA 1. Diferentes tipos de contorno de superficies.....	39
FIGURA 2. Respuesta de los genotipos evaluados A la regeneración de plantas verdes.....	53
FIGURA 3. Respuesta a la regeneración de plantas verdes de los tratamientos agrupados por tipo de regulador del crecimiento.....	53
FIGURA 4. Respuesta al número de brotes por callo De los tres genotipos evaluados.....	56
FIGURA 5. Respuesta al número de brotes por callo de los tratamientos agrupados por tipo de regulador del crecimiento.....	56
FIGURA 6. Respuesta a la altura de brotes de los tres genotipos evaluados.....	58
FIGURA 7. Respuesta a la altura de brotes de los tratamientos agrupados por tipo de regulador del crecimiento.....	59
FIGURA 8. Superficie de respuesta para el genotipo MPI-116. A, Porcentaje de regeneración de plantas verdes. B, Número de brotes por callo. C, Longitud de brotes. CIN - ANA.....	61
FIGURA 9. Superficie de respuesta para el genotipo MPI-116. A, Porcentaje de regeneración de plantas verdes. B, Número de brotes por callo. C, Longitud de brotes. BAP - ANA.....	62
FIGURA 10. Superficie de respuesta para el genotipo COLOMGUA. A, Porcentaje de regeneración de plantas verdes. B, Número de brotes por callo. C, Longitud de brotes. CIN - ANA.....	63

- FIGURA 11. Superficie de respuesta para el genotipo COLOMGUA. A, Porcentaje de regeneración de plantas verdes. B, Número de brotes por callo. C, Longitud de brotes. BAP - ANA..... 64
- FIGURA 12. Superficie de respuesta para el genotipo LA-43. A, Porcentaje de regeneración de plantas verdes. B, Número de brotes por callo. C, Longitud de brotes. CIN - ANA..... 65
- FIGURA 13. Superficie de respuesta para el genotipo LA-43. A, Porcentaje de regeneración de plantas verdes. B, Número de brotes por callo. C, Longitud de brotes. BAP - ANA..... 66

**KINETIN (KIN), BENZYLAMINOPURINE (BAP) AND NAPHTHALENE ACETIC ACID (NAA),
EFFECT ON THE *IN VITRO* PLANT REGENERATION FROM UNDIFFERENTIATED TISSUE OF
RICE (*Oryza sativa* L.)**

**EFFECTO DE LA CINETINA (CIN), BENCILAMINOPURINA (BAP) Y ÁCIDO
NAFTALENACETICO (ANA), SOBRE LA REGENERACIÓN DE PLANTAS *IN VITRO*, A PARTIR
DE TEJIDO NO DIFERENCIADO DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)**

RESUMEN

Siendo el arroz el tercer grano básico en nuestro país, se hace importante investigar aspectos relevantes en lo relacionado a variedades que tienen un gran potencial, tanto económico, como también de importancia para el consumo interno. Pero para lograr este potencial implica, entre otros factores, el desarrollo de variedades con alto potencial de rendimiento adaptadas a nuestros ecosistemas de cultivo. Determinar la respuesta a la regeneración de plantas inherente a los genotipos que se desea mejorar en Guatemala, así como una adecuada combinación de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, que resulte en una eficiente regeneración de plantas provenientes del embrión de semilla madura de arroz, permitirá que la biotecnología contribuya aún más en el proceso de mejoramiento genético que se lleva a cabo en nuestro país, específicamente, mediante la generación de variabilidad inducida durante el proceso de regeneración de somaclones. Generando con ello, conocimientos que permitan regenerar plantas de cultivares de arroz a partir de tejido no diferenciado con alto grado de variabilidad para seleccionar características deseables en ellas, como resistencia a plagas y enfermedades, alta calidad molinera, altos rendimientos, entre otras. Este trabajo de investigación fue desarrollado en el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), ubicado en el Km 21.5 carretera a Amatitlán, Bárcena, Villa Nueva, cuyos objetivos que pretendía eran de determinar la combinación de reguladores de crecimiento que regenerara la mayor cantidad posible de plantas verdes y el genotipo que presenta la mayor frecuencia de regeneración de plantas verdes. El medio de cultivo que se utilizó tanto para la inducción de callos, como para la regeneración de plantas de arroz, fue el de Murashige y Skoog (MS), variando únicamente las diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento las cuales fueron: cinetina 0, 3, 4, 5 mg/l, bencil aminopurina 0, 0.2, 1, 2 mg/l y ácido naftalenacetico 0, 0.25, 0.50, 0.75mg/l. Las variables de respuesta fueron analizados en 57 tratamientos, consistentes en 19 combinaciones de citocininas (BAP y cinetina) y auxina (ANA), y tres genotipos (ICTA COLOMGUA, MPI 116 y LA 43). Cada tratamiento se repitió 10 veces, haciendo un total de 570 unidades experimentales para

los tres genotipos, la unidad experimental estuvo constituida por un tubo de cultivo de 150 x 25 mm. Previo a una prueba de normalidad, los resultados presentados y su discusión se basaron en los promedios obtenidos de cada tratamiento y de su comparación a través de pruebas de "t" de Student al 5% de significancia estadística. Los resultados indican que para la variable porcentaje de regeneración de plantas verdes los mejores tratamientos fueron: 0.2 mg/l de BAP + 0.50 mg/l de ANA, con un promedio de 46.7%; 3 mg/l de CIN + 0.50 mg/l de ANA con un promedio de 40%; 3 mg/l de CIN + 0.25 mg/l de ANA con un promedio de 36.7%; 0.2 mg/l de BAP + 0.75 mg/l de ANA con un promedio de 33.3%; 2 mg/l de BAP + 0.75 mg/l de ANA con un promedio de 30%; 4 mg/l de CIN + 0.25 mg/l de ANA con un promedio de 26.7% y 5 mg/l de CIN + 0.75 mg/l de ANA con un promedio de 26.7%. De los tres genotipos evaluados, el que mejor respondió a la regeneración de plantas fue MPI-116 con un promedio de 40.0%, seguido de COLOMGUA que presentó 16.3% y por último LA- 43 con 4.7%. Para los tratamientos agrupados por tipo de reguladores utilizados en el medio de cultivo, no se encontró diferencia entre utilizar la combinación CIN-ANA o BAP-ANA, que presentaron 20.4 y 21.9 % respectivamente, de regeneración de plantas verdes. Mientras que para la variable número de brotes por callo, los mejores tratamientos estadísticamente fueron: 0.2 mg/l de BAP + 0.50 mg/l de ANA con un promedio de 1.7 brotes; 0.2 mg/l de BAP + 0.75 mg/l de ANA con un promedio de 1.6 brotes; 3 mg/l de CIN + 0.50 mg/l de ANA con un promedio de 1.5 brotes; 3 mg/l de CIN + 0.25 mg/l de ANA con un promedio de 1.3 brotes; 5 mg/l de CIN + 0.75 mg/l de ANA con un promedio de 1.0 brotes; 1 mg/l de BAP + 0.25 mg/l de ANA con un promedio de 1.0 brotes; 4 mg/l de CIN + 0.75 mg/l de ANA con un promedio de 0.7 brotes; 2 mg/l de BAP + 0.50 mg/l de ANA con un promedio de 0.7 brotes y 2 mg/l de BAP + 0.75 mg/l de ANA con un promedio de 0.7 brotes. El número de brotes por callo resultó diferente para los genotipos evaluados, siendo MPI-116 el que presentó la mayor respuesta con 1.4 brotes, seguido de COLOMGUA que tuvo 0.6 brotes y por último LA-43 con 0.2 brotes. Los tratamientos con base al tipo de citocinina, no se encontró diferencia entre utilizar la combinación CIN-ANA o BAP-ANA, mostrando un promedio de 0.7 y 0.8 brotes por callo, respectivamente; y para la variable altura de brotes, los tratamientos con diferentes niveles de reguladores del crecimiento y el testigo se presentó en un rango de 1.9–7.9 cm, sin embargo, la prueba de comparación de medias determinó que son iguales estadísticamente, lo mismo para los tres genotipos evaluados y las combinaciones CIN-ANA o BAP-ANA, lo que nos indica que los niveles de reguladores dentro del medio de cultivo evaluados en este trabajo, no ejercen influencia sobre la altura de los brotes regenerados. Además, se realizó un análisis de regresión múltiple tipo superficie de respuesta, con el cual se predicen en forma separada GENOTIPO-CIN-ANA y

GENOTIPO-BAP-ANA, los posibles rangos de reguladores del crecimiento para aumentar la respuesta de las variables medidas; de ello es que para el genotipo MPI-116, cuando se utilizó CIN-ANA en el medio de cultivo, predice que utilizando cantidades de 3.3 mg/l de CIN con 0.4 mg/l de ANA, se puede obtener como mínimo un 55% de plantas verdes, entre 1.6-1.8 brotes y entre 2.6-3.0 cm de altura para cada brote. Cuando se utilizó BAP-ANA, predice que con cantidades menores de 0.3 mg/l de BAP y cantidades mayores de 0.7 mg/l de ANA se puede obtener como mínimo 60% de plantas verdes, 2.08 brotes y entre 2.4-2.6 cm de altura para cada brote, mientras que para el genotipo COLOMGUA, cuando se utilizó CIN-ANA en el medio de cultivo, predice que utilizando cantidades menores de 3.9 mg/l de CIN y cantidades menores de 0.25 mg/l de ANA, se puede obtener como mínimo un 45% de plantas verdes, entre 1.6-1.4 brotes y 2.7 cm como mínimo de altura para cada brote. Cuando se utilizó BAP-ANA, predice que con cantidades menores de 0.3 mg/l de BAP y cantidades que van entre 0.50-0.75 mg/l de ANA se puede obtener como mínimo 24% de plantas verdes, entre 0.98-1.11 brotes y entre 0.75-1.20 cm de altura para cada brote y para el genotipo LA-43 cuando se utilizó CIN-ANA en el medio de cultivo, con cantidades menores de 3.3 mg/l de CIN y entre 0.40-0.65 mg/l de ANA, se puede obtener, como mínimo, un 9% de plantas verdes, entre 0.12-0.15 brotes y entre 0.50-0.60 cm de altura para cada brote. Cuando se utilizó BAP-ANA, predice que con cantidades menores de 0.2 mg/l de BAP y cantidades que van entre 0.45-0.65 mg/l de ANA se puede obtener como mínimo 26% de plantas verdes, entre 0.75-0.88 brotes y entre 1.2-1.4 cm de altura para cada brote.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de arroz es, sin duda alguna, uno de los más importantes del mundo, aportando un 20% de calorías y 13% de proteínas en la dieta humana. En Asia, se consume el 90% de arroz, representando el 50% de alimento consumido en el mundo. En el futuro se pretende mejorar las dos subespecies, Japónica e Indica, utilizando técnicas convencionales y biotecnológicas para dar origen a nuevas variaciones (21).

Siendo el arroz el tercer grano básico en nuestro país, se hace importante investigar aspectos relevantes en lo relacionado a variedades que tienen un gran potencial, tanto económico, como también de importancia para el consumo interno.

Guatemala tiene las condiciones para autoabastecerse de arroz y aún obtener excedentes para exportación. Para lograrlo implica, entre otros factores, el desarrollo de variedades con alto potencial de rendimiento adaptadas a nuestros ecosistemas de cultivo. Esta es la tarea constante de la Subárea de Granos Básicos del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA).

Siguiendo la tendencia mundial, el ICTA se ha sumado a este esfuerzo, mediante la adopción y adaptación de técnicas como el cultivo de anteras.

La regeneración de plantas a partir de células somáticas, es otra técnica que ha demostrado ser de utilidad en los programas de mejoramiento genético. En el caso de arroz se utiliza con mayor frecuencia la regeneración por vía indirecta, es decir, mediante la producción de tejidos no diferenciado, denominado comunmente callo.

En el presente trabajo se evaluó la respuesta de tres genotipos de arroz, así como el efecto de 18 diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento en la regeneración de plantas a través de inducción de callo proveniente de embrión de semilla madura.

Se indujo la formación de callos, para después regenerar plantas en un medio de cultivo con diferentes concentraciones de citocininas, que para este caso fue la cinetina (CIN), en concentraciones de 3, 4 y 5 mg/l; bencilaminopurina (BAP), en concentraciones de 0.2, 1 y 2 mg/l y la auxina ácido naftalenacético (ANA) en concentraciones 0.25, 0.50 y 0.75 mg/l.

Los genotipos que se usaron en el presente trabajo son: la variedad ICTA COLOMGUA y las líneas MPI-116, y LA-43 debido a que son de gran interés investigativo para la subárea de mejoramiento genético de arroz.

El trabajo de investigación fue desarrollado en el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), ubicado en el Km 21.5 carretera a Amatitlán, Bárcena, Villa Nueva.

2. DEFINICION DEL PROBLEMA

Ha sido ampliamente demostrado que la respuesta a la regeneración de plantas *in vitro* está influenciada por el genotipo, así como la composición del medio de cultivo, el tipo y la combinación de reguladores del crecimiento (3).

En el caso de la planta de arroz, se ha reportado inducción de callo a partir de diferentes explantes en diversos medios de cultivo, regeneración de plantas utilizando diferentes reguladores de crecimiento en varias concentraciones, así como diferentes respuestas entre genotipos.

La inducción de callo y posterior regeneración de plantas tienen, entre sus aplicaciones, contribuir en los programas de mejoramiento genético mediante la generación de variación somaclonal. Sin embargo, para poder seleccionar variantes útiles, es necesario regenerar un número considerable de plantas.

Debido a que se tiene una escasa eficiencia en la regeneración de plantas a partir de tejido no diferenciado, se realizó la presente investigación que contribuirá como una herramienta más para una eficiente regeneración de plantas *in vitro* de arroz.

3. JUSTIFICACION

Determinar la respuesta a la regeneración de plantas inherente a los genotipos que se desea mejorar en Guatemala, así como una adecuada combinación de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, que resulte en una eficiente regeneración de plantas provenientes del embrión de semilla madura de arroz, permitirá que la Biotecnología contribuya aún más en el proceso de mejoramiento genético que se lleva a cabo en nuestro país, específicamente, mediante la generación de variabilidad inducida durante el proceso de regeneración de somaclones. Generando con ello, conocimientos que permitan regenerar plantas de cultivares de arroz a partir de tejido no diferenciado con alto grado de variabilidad para seleccionar características deseables en ellas, como resistencia a plagas y enfermedades, alta calidad molinera, altos rendimientos, entre otras.

4. MARCO TEORICO

4.1 Marco Conceptual

4.1.1 Generalidades del Cultivo de Arroz (Oryza sativa L.)

El arroz (Oryza sativa L.), es una gramínea anual, pubescente según la especie. Desarrollo erecto, a veces flotante. Tallos dispuestos en manojos con alturas que oscilan entre 0.50 y 1.60 m para las variedades cultivadas tanto en seco como bajo riego controlado. Sin embargo, también existen variedades que pueden alcanzar alturas de 5 y 6 m (21).

El sistema radical es fibroso, como en todas las gramíneas. El tallo es cilíndrico, erecto, a veces anguloso y liso, y está compuesto por una serie de nudos y entrenudos en orden alterno. Las hojas son lineales mas o menos largas de 50-75 cm y de 5 a 15 mm de ancho. La inflorescencia del arroz es una panícula terminal de 5 a 30 cm de largo. Las flores son hermafroditas con seis estambres, característica que diferencia al arroz de las otras gramíneas. Además, están provistas de un pistilo, dos estigmas y estilos plumosos. Las envolturas florales son la lema y la palea, las cuales constituyen las estructuras que formarán la cáscara que envuelve el grano después de la trilla (21).

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Sistemática (Cronquist 1,981)

Reino:	Vegetal
Sub-reino:	Embryobiontha
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliópsida
Sub-clase:	Commelinidae
Orden:	Cyperales
Familia:	Poaceae (Gramínea)
Género:	Oryza
Especie:	<u>O. Sativa</u> L.

El arroz ocupa el segundo lugar en importancia, después del trigo a nivel mundial. Es el alimento básico para la mitad de la población mundial. Gran parte de la producción de arroz en el mundo se encuentra en Asia (16).

La producción mundial es:

Superficie:	14,2842, 000 ha.
Rendimiento Mundial:	2,566 kg/ha. (16)

El grano de arroz está formado de los siguientes elementos constitutivos:

Agua	10.0 a 14.0%
Proteínas	5.0 a 10.0%
Grasa	0.6 a 3.0%
Carbohidratos	73.0 a 81.0%
Fibra	0.2 a 1.0%
Ceniza	0.8 a 2.8% (16)

Para los guatemaltecos el arroz está considerado como el tercer grano alimenticio básico de mayor importancia. Se ha determinado que el consumo promedio aumentó de 2.6 kg por habitante en el período de 1,979-1981, estimándose para 1,984 un consumo promedio de 5.5 kg/habitante/año. Algunos indicadores, estiman que para el área urbana, los consumos promedios varían entre 3 a 12 kg/habitante/año, según estratos de niveles de ingresos (12).

Para el período 1,998-1,999 se tenía un área cosechada de 19,000 mz, con una producción de 885,000 quintales, que hacen un rendimiento promedio de 46.60 qq/mz; se tenía una importación estimada de 12,200 quintales que hacen un total aproximado de Q 1,599, 584.00; una exportación estimada de 33,200 quintales que hacen un total aproximado de Q. 7,896, 788.00. (11).

4.1.2 Cultivo de Tejidos

4.1.2.1 Antecedentes históricos

Haberlandt, en 1,902, vaticinó que podría ser posible cultivar células somáticas en medio de cultivo. El indicaba que el medio de cultivo podía ser manipulado de tal manera que las células vegetales pudieran reproducir *in vitro* la secuencia de desarrollo que ocurre en una planta intacta. Esto induciría a su vez partiendo de una célula aislada su desarrollo hasta formar una planta completa y viable. Si esto era demostrado, entonces estaría probado que una célula aislada es totipotente (19).

White, en 1,934, treinta años después de las predicciones de Haberlandt, aisló tejido de segmentos de punta de raíz de tomate y cultivó durante períodos prolongados raíz de tomate en un medio líquido que contenía sales inorgánicas, extracto de levadura y sacarosa. Poco tiempo después, reemplazó exitosamente el extracto de levadura por tres vitaminas: tiamina, piridoxina y ácido nicotínico (19).

Al mismo tiempo, Gautheret, en 1,934, logró promover el desarrollo de callo en tejido de sauce y de otras especies leñosas, indujo al crecimiento agregando al cultivo las vitaminas de White y la auxina ácido indol-acético, que acababa de ser descubierta. En 1,939, Gautheret logró establecer un cultivo de callo de la planta de tabaco con un crecimiento potencialmente ilimitado (19).

Las técnicas de cultivo de tejidos fueron avanzando a medida que nueva información sobre reguladores del crecimiento se generaba. Al comienzo de los años 40's, por ejemplo, se descubrió que la leche de coco estimulaba el crecimiento de los embriones de *Datura*. Además, demostró que la auxina sintética ácido 2,4-diclorofenoxi-acético (2,4-D) promovía la división de células en especies vegetales que antes presentaban dificultades para hacer crecer en medio de cultivo (19).

Skoog, en 1,954, descubrió que el callo del tabaco proliferaba cuando se cultivaba en un medio que tenía como uno de sus ingredientes una muestra de ADN proveniente del semen de pescado. El componente activo responsable de este crecimiento prolífico fue la 6-furfurilpurina, a la que le dio el nombre de "cinetina". Cuando se agregó cinetina a los medios de cultivo, fue posible inducir la formación y proliferación de callos de un gran número de especies de plantas. Skoog y Miller, en 1,957, lograron que las células de callos se desarrollaran como raíces o yemas, o las dos cosas, en cultivo de tejido de tabaco. Ellos comprobaron que la diferencia en raíces dependía de la proporción entre cinetina y auxina en el medio de cultivo, demostrando así la importancia de la composición del sustrato. Murashige y Skoog, en 1,962, publicaron un trabajo sobre composición de un medio de cultivo de tejidos de tabaco, que posteriormente fue útil para muchas especies de plantas (22).

En los años siguientes, se logró en muchas especies de plantas el completo desarrollo a partir de células aisladas, el desarrollo de plantas haploides a partir de granos inmaduros de polen mediante el cultivo de anteras y regeneración de plantas a partir de protoplastos (22).

Según Efferson (9), el cultivo de tejidos es la técnica que más promete resultados inmediatos en la producción de variedades mejoradas de plantas, comprende el uso de técnicas que involucran la evaluación de células vegetales individuales en vez de plantas obtenidas por semilla. A diferencia de los animales las células vegetales no sexuales de muchas especies pueden estimularse mediante cierto tratamiento, de tal forma que de ellas se puedan originar plantas enteras, este fenómeno se conoce como totipotencia. En el cultivo de tejidos se utiliza una variedad de técnicas, algunas de ellas permiten aprovechar la variación somaclonal. En este proceso se pueden obtener células vegetales individuales, manipularse por diversos medios y posteriormente obtener la regeneración de plantas; las plántulas originadas a partir de células individuales se desarrollan y llegan a producir semillas, la descendencia de estas semillas puede ser utilizada para seleccionar por productividad, resistencia a enfermedades y otras características; al comparar las diferencias con la planta original, no se conoce claramente las razones para las variaciones entre la planta madre y su descendencia, pero este método permite seleccionar tipos mejorados entre las plantas regeneradas por cultivo de tejidos.

4.1.2.2 Importancia del cultivo de tejidos

Para Villalobos (25) el cultivo de tejidos combina las técnicas corrientes de fitomejoramiento con los nuevos métodos biotecnológicos y ofrece la oportunidad de reducir el tiempo para la producción de variedades mejoradas. En la mayoría de los cultivos de importancia económica se necesitan de 7 a 10 años, después del cruzamiento, para saber si se ha obtenido una variedad mejorada, mientras en cultivo de tejidos las mutaciones que parecen prometedoras pueden identificarse en un año o dos. Esto ofrece la ventaja de la reducción del tiempo y el volumen de siembra en campo requeridas por los métodos convencionales.

La opinión de Efferson (9) es que el cultivo de tejidos no reemplaza completamente a los métodos convencionales, pues las grandes variaciones tienen lugar en el cruzamiento sexual, en tanto existe menos variación entre las células de una planta o variedad individual, no obstante es un buen método complementario en un programa de mejoramiento.

Entre las ventajas del cultivo de tejidos *in vitro* en general se cuenta (19):

- a) **Propagación acelerada:** es posible, teóricamente, obtener en un año, a partir de una sola planta, un millón de clones de ella.
- b) **Ahorro y ganancia de espacio:** en espacio reducido es posible mantener cantidades considerables de clones que servirán como semilla en el campo, por área disponible. Permite hacer uso del área vertical, acumulando varios niveles para el efecto.
- c) **Ausencia de infecciones y factores climáticos adversos:** debido a las condiciones asépticas en que se tienen los explantes están libres de contaminantes, por lo que se cuenta con material que tiene la capacidad de someterse a las pruebas más rigurosas de cuarentena.
- d) **Disponibilidad inmediata y permanente del material:** permite el acceso oportuno a la micropopagación en épocas en que las condiciones del campo no son las adecuadas.

Las desventajas están basadas en (19):

- a) Altos costos de mantenimiento e instalación de laboratorio.
- b) Necesidad de tener mano de obra calificada.
- c) Falta de presión de selección de los materiales con que se cuenta.
- d) Pérdida de variabilidad que para algunas técnicas no es posible evitar.

4.1.3 Reguladores de crecimiento

Los reguladores de las plantas se definen como compuestos orgánicos que, en pequeñas cantidades, fomentan, inhiben o modifican de alguna manera cualquier proceso fisiológico vegetal. Las hormonas de las plantas o fitohormonas, son reguladores producidos por las mismas plantas que, en bajas concentraciones, regulan los procesos fisiológicos de aquellas y por lo general se desplazan de un lugar de producción a un sitio de acción (27).

En realidad es muy difícil definir el término hormona vegetal con toda precisión. Muchas sustancias del tipo hormonal pueden actuar en su lugar de síntesis, actúan al parecer de modo no específico o actúan a nivel genético como inductores o represores. A menudo se prefiere el

término fitoregulador, refiriéndose a compuestos naturales o sintéticos que inducen respuestas en el crecimiento, desarrollo o metabolismo (2).

Las hormonas son, por definición, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo; que actúan generalmente en lugares diferentes donde son producidas y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades. También se han desarrollado otro tipo de hormonas sintéticas que pueden tener un efecto semejante a las naturales (27).

Las auxinas y las citocininas son componentes importantes en el control de la morfogénesis *in vitro*. Las concentraciones de las auxinas en los medios varían de 0.01 a 10 mg/l. Las auxinas más usadas son ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). El AIA es la auxina natural menos estable, siendo destruido a pH bajo. La luz también descompone esta auxina, en una reacción denominada oxidación catalítica, después de 12 días de exposición a intensidad luminosa de 1,500 lux, 10 - 15% de AIA fue descompuesto (27).

Las auxinas 2,4-D y ANA son sintéticas y tienen efectos semejantes a las auxinas de ocurrencia natural. Las auxinas son disueltas en NaOH 1N, se usa 0.3 ml de esta base para disolver 10 mg de auxina (27).

Las citocininas son derivadas de la adenina y tienen un papel fundamental en la diferenciación y regeneración de plantas en la mayoría de las especies. Inducen la división celular, proliferación y morfogénesis de la parte aérea. Las citocininas más usadas en cultivo de tejidos son: la cinetina (CIN), benciladenina (BA) o bencilaminopurina (BAP) y zeatina (Zea). Las concentraciones recomendadas de estas sustancias varían de 0.03 a 30 mg/l. La cinetina y zeatina son considerados termoestables, una vez que ningún producto de su descomposición fue observado después de ser autoclavadas a 120 grados centígrados durante una hora. Las citocininas son disueltas en HCl 1N. Se utiliza 0.3 ml de éste ácido para disolver 10 mg de citocinina. Las hormonas y las sustancias reguladoras de crecimiento no deben ser disueltas en alcohol, pues este producto tiene efecto inhibitor en la morfogénesis (23).

4.1.3.1 Auxinas

a. Función de las auxinas

Las auxinas actúan en tres fenómenos: aumento en el alargamiento celular; incremento de la respiración y del metabolismo energético; cambio en el tipo de ARN. Las enzimas y proteínas son la base de muchos efectos auxínicos, que son los más notables a primera vista y los más importantes en agricultura (7).

Las auxinas desempeñan un papel importante en la fase de alargamiento en muchos órganos. En general, se considera que el alargamiento celular se produce únicamente en presencia de auxinas y que cuando hay un aumento en la concentración de éstas, aumenta también el alargamiento, siempre que no actúen otros factores limitantes (8).

Los límites máximos de concentración para el alargamiento celular varían grandemente con los diferentes tejidos y las concentraciones, por lo general, ejercen efectos inhibitorios sobre ésta fase del crecimiento (8).

b. Mecanismo de acción de las auxinas

Las auxinas parecen tener dos efectos principales en el proceso de alargamiento celular; aumentan la plasticidad de la pared y participan directa o indirectamente en las reacciones mediante las cuales se depositan nuevas moléculas de celulosa dentro de las paredes; sin embargo, el efecto de las auxinas en el desarrollo de la pared celular se considera en la actualidad no como un efecto directo sino como una posible expresión final de un proceso metabólico condicionado o regulado por la hormona (8).

Hay pruebas abundantes de que las auxinas actúan primariamente como agentes catalíticos o reguladores en alguna fase del metabolismo de los carbohidratos (8).

Se conocen algunos compuestos que suelen denominarse antiauxinas, las cuales contrarrestan o perturban el efecto común de las auxinas de favorecer el crecimiento. Existen en la célula varias moléculas que pueden tomar el lugar de la auxina por tener una configuración química parecida, pero que al unirse con el compuesto (sea este enzima, ADN, ARN o cualquier metabolito), con el que se debería iniciar la reacción, forman un complejo

inerte, así que no son capaces de inducir acciones metabólicas y en cambio bloquean la acción de la auxina (8).

c. Papel de las auxinas en la formación de las raíces

Se debe distinguir claramente entre el efecto de las auxinas sobre la formación de las raíces y su efecto sobre el alargamiento radicular. En general, las concentraciones requeridas para el primero de éstos procesos son mucho mayores que para el segundo (8).

Un efecto importante de la auxina, que también implica división de células, es el de provocar la iniciación de raíces laterales y adventicias en la raíz y en el brote. Este efecto tiende a correlacionar el grado de ramificación del sistema radical con el grado de desarrollo de yemas de brote. Más aún, debido al transporte polar hacia abajo, la auxina tiende a acumularse justamente arriba de cualquier sitio dañado en el tallo o en el sistema radical. Esta acumulación estimula la iniciación de raíces adventicias en el lugar dañado, con lo que promueve la regeneración de las raíces perdidas y aumenta las probabilidades de supervivencia de las partes aéreas de una planta después que haya sufrido una lesión abajo o al nivel del suelo (8).

d. Utilización de auxinas para estimular el enraizamiento

Entre los que comúnmente se utilizan, uno de los mejores estimuladores del enraizamiento es la auxina AIB. Tiene una actividad auxínica débil y los sistemas de enzimas destructores de auxinas, la destruyen en forma relativamente lenta. Un producto químico persistente resulta muy eficaz como estimulante de las raíces. Debido a que el AIB se desplaza muy poco, se retiene cerca del sitio de aplicación. Los reguladores del crecimiento que se desplazan con facilidad pueden causar efectos indeseables de crecimiento en la planta propagada (27).

Otra auxina excelente utilizada con frecuencia en la promoción de raíces es el ANA. Sin embargo, este compuesto es más tóxico que el AIB y deben evitarse las concentraciones excesivas de ANA por el peligro de provocar daños a las plantas (27).

El AIB y el ANA resultan más efectivos en la inducción del enraizamiento que el AIA. El AIA es muy inestable en las plantas y se descompone rápidamente en soluciones no esterilizadas aun cuando permanece activo en soluciones estériles durante varios meses. Los rayos fuertes del sol pueden destruir en 15 minutos una solución de 10 ppm de AIA (27).

Las amidas de AIB y ANA son también agentes muy efectivos del enraizamiento. La forma amida del ANA es menos tóxica que el AIB y, por tanto, puede utilizarse con mayor seguridad. Otros homólogos son agentes eficaces de enraizamiento, aunque ninguno de ellos sea superior al ANA (27).

Muchos compuestos de fenoxi promueven la formación de raíces cuando se emplean en bajas concentraciones. Al aplicarlos en concentraciones muy elevadas tienden a producir raíces gruesas y atrofiadas y su límite de toxicidad se aproxima a la concentración óptima para la iniciación de raíces (27).

Los reguladores del crecimiento pueden modificar tanto el tipo de raíces como el número en que se produzcan. El AIB produce un sistema de raíces fuertes y fibrosas, mientras que los ácidos fenoxiacéticos a menudo producen un sistema de raíces atrofiado y matoso, compuesto de raíces dobladas y gruesas. Las sustancias promotoras del enraizamiento son a menudo más eficaces cuando se utilizan en combinación (27).

e. Antiauxinas

Si las moléculas con actividad auxínica lo son, en tanto sean capaces de unirse a un centro activo, es lógico pensar que moléculas que no cumplan totalmente las condiciones para unirse pueden actuar como antagonistas de las moléculas con actividad auxínica (7).

La primera molécula en que se detectó acción antiauxínica fue la del ácido *n*-fenilbutírico. Sin embargo, la molécula que más cerca está del prototipo de antiauxina es el ácido 2,4-diclorofenoxi isobutírico. El mecanismo de acción no está claro, aunque el hecho de que la actividad óptica sea determinante en la existencia de actividad auxínica apoya el concepto de una estrecha asociación con una superficie fija y cargada (7).

f. Efecto tóxico de las auxinas

La aplicación de auxinas, en concentraciones relativamente altas, produce como resultado la aparición de deformaciones de crecimiento en las plantas, tales como distorsiones en las hojas, tallos, raíces, decoloración de las hojas, inhibición del alargamiento del tallo o las raíces y de la apertura floral, así como la formación de tumores. El conocimiento de que las auxinas cuando son aplicadas en concentraciones relativamente altas pero efectivamente bajas, ejercen efectos tóxicos o letales sobre las plantas, condujo a la idea de que se les podía emplear con el propósito de matar malas hierbas u otras plantas nocivas (8).

4.1.3.2 Citocininas

a. Actividad Biológica

Las citocininas comprenden una clase separada de sustancias de crecimiento y reguladores de crecimiento. Producen un efecto menor cuando se aplican a plantas intactas, pero estimulan la síntesis de proteínas. Esta quizá sea la razón por la cual ellas pueden promover la maduración de los cloroplastos y retrasar la senescencia separada de hojas.

El efecto de las citocininas es mas notable en cultivo de tejidos donde son usadas juntamente con las auxinas, estimulando la división celular y controlando la morfogénesis. Al agregar tejidos al medio de cultivo, cortan la dominancia apical y liberan brotes laterales. En este aspecto, al respecto, parecen tener un efecto opuesto a auxinas endógenas (10).

La primera citocinina descubierta fue la cinetina, aislada por el profesor Skoog en el laboratorio de la universidad de Wisconsin, siguiendo con experimentos que promovieron continuos crecimientos de callos formados a partir de secciones de tallos de tabaco sobre medios nutritivos (10).

La cromatografía de etanol soluble de fracciones de extracto de levadura indicaron que esta sustancia fue una purina, otro origen de ocurrencia natural de purinas fue examinado por la habilidad de promover continuos callos. El nuevo regulador de crecimiento fue denominado cinetina porque estimulaba la división celular. En términos generales el nombre de citocinina fue propuesto para cubrir todos aquellos componentes con similar actividad (10).

b. Modo de Acción

El modo de acción de las citocininas en las plantas es incierto. Se fundamentan al estar presentes en la transferencia molecular de ARN, pero todavía no está claro. En algunas circunstancias pueden ser mostradas en actividades de síntesis de ARN, estimulando la síntesis de proteínas y actividades enzimáticas (10).

La acción de las citocininas es dependiente de la luz. En azul, rojo claro y blanco, por ejemplo, en la proliferación de esquejes de Prunus poe, BAP fue dependiente sobre la velocidad de la influencia del protón y la proliferación de esquejes por citocininas fue promovido por una baja respuesta de energía fitocrómica. Cuando se induce la proliferación en obscuridad o baja influencia de rojo claro el BAP inhibe la elongación de los brotes. La promoción de brotes axilares por BAP y la inhibición de brotes elongados, son por lo tanto dos procesos independientes (10).

c. Efectos en el Cultivo de Tejidos

c.1 Estimulación de la División Celular

En cultivo de tejidos, las citocininas parecen ser necesarias en la división celular. En el medio donde la citocinina es limitada, la división celular puede detenerse en un estado del ciclo celular. En subcultivos de tejidos dentro del medio que contiene citocinina, puede causar la división celular sincronizada después de un retrasado período. Tejidos de callos en donde la división celular se produce fuera de la adición de citocininas en el medio de cultivo, son capaces de producir sus propios reguladores de crecimiento natural (10).

La proliferación de callos en tejidos de plantas dicotiledóneas es usual, aunque requiere de la presencia de auxinas y citocininas en el medio. Así, donde crece por un día en un medio basal conteniendo 0.2 mg/l de cinetina, después es transferido por 20 días a otro medio basal que contiene 1.8 mg/l de AIA, más callos son producidos donde algunas cantidades de auxinas y citocininas fueron disponibles juntas (10).

Callos dicotiledóneos, o suspensión de cultivos requiriendo de auxinas (ejemplo 1 mg/l AIA) pero no citocininas, pueden ser cultivados por largos períodos fuera de auxinas, cuando una alta concentración de citocininas (ejemplo 0.1-1 mg/l cinetina) es agregado a este medio (10).

c.2 Formación de Brotes Adventicios

Las citocininas son muy efectivas para promover directa o indirectamente la iniciación de brotes y al ser agregadas al medio, forma los brotes de una superficie meristemática y raíces producidas dentro del callo. Un balance entre auxinas y citocininas, normalmente dan la más efectiva organogénesis. La secuencia normal de la organogénesis es, por lo tanto, opuesta (10).

c.3 Embriogénesis

Una baja concentración de citocininas (entre 0.5-2.5 μM) es frecuentemente agregado al medio para la inducción de callos embriogénicos, especialmente en plantas de hoja ancha. Esta es alguna sugerencia de citocininas que pueden impedir la embriogénesis en monocotiledóneas: 0.001 μM de citocinina exógena. La presencia de citocininas endógenas, pueden ser también responsables de la inhabilidad para obtener embriogénesis en algunos genotipos (10).

d. Uso en Cultivo de Brotes

d.1 Proliferación de Brotes axilares

Fortalece el crecimiento de los brotes axilares, reduce la dominancia apical en brotes de plantas de hoja ancha, una o más citocininas son usualmente incorporados en el medio durante la etapa II. A sucesivos tratamientos inducen el crecimiento de varios pequeños brotes de cada explante dentro de 4-6 semanas. Cuando el porcentaje de citocinina es alto, causa muchos brotes pequeños y fracasa la elongación, pueden causar en hojas una forma inusual y/o inducir brotes hiperhídricos (10).

d.2 Formación de Brotes adventicios

La formación de brotes adventicios, sea directamente del tejido del explante, o indirectamente del callo, es regulado por una interacción entre auxinas y citocininas (10).

d.3 Inhibición de la Formación de Raíces

Altas concentraciones de citocininas (0.2-10 mg/l) inhiben o retardan la formación de raíces, previenen el crecimiento de raíces y promueven el efecto de las auxinas sobre la iniciación de raíces. Por esta razón las citocininas son omitidas en el medio de cultivo en la etapa III (10).

A pesar de estas observaciones hay reportes de que las citocininas pueden promover el crecimiento de las raíces o la formación de las raíces adventicias en ausencia de auxinas. En casi todos los casos, solamente un bajo porcentaje de citocininas son efectivas, por ejemplo, brotes de remolacha de azúcar se enraizaron en medio MS que contenía 0.5 mg/l de cinetina y nada de auxinas. En Rosa hybrida "White Dream" requirió de la adición de 1 mg/l de BAP o IBA para la inducción de raíces y su desarrollo (10).

4.1.3.3 Biosíntesis de la Auxina

En los primeros años de estudio de la auxina, se vio que en los cultivos de Rhizopus suinus podía aumentarse la producción de AIA si se enriquecía el medio con peptona. Posteriormente pudo demostrarse que este aumento de síntesis de AIA era consecuencia del enriquecimiento del medio con el aminoácido triptófano que se convertía en AIA. Desde entonces se ha demostrado claramente que el triptófano es el precursor del AIA. Las vías de síntesis del AIA se basa en la evidencia obtenida a partir de la presencia de intermediarios y su actividad biológica y el aislamiento de enzimas capaces de convertir *in vitro* estos intermediarios en AIA. Así se han podido establecer cuatro vías de biosíntesis que son (7).

a. Vía del Acido Indolpirúvico

La primera etapa del proceso, esto es, la formación del ácido indolpirúvico a partir del triptófano es catalizada por una aminotransferasa inespecífica, que también puede utilizar ácido glutámico y aspártico y aminoácidos aromáticos como donadores del grupo aminol. La segunda enzima sería ácido indolpirúvico descarboxilasa, aislada y purificada de varios materiales. La última enzima en esta vía biosintética que cataliza el paso de indolacetaldehído a AIA no es siempre la misma, ya que hay diferentes enzimas según la especie. Podemos concluir que, aunque debido a su gran inestabilidad no ha sido posible demostrar que el ácido indolpirúvico es un intermediario en la biosíntesis del AIA, existen otras pruebas que lo confirman (7).

b. Vía de la Triptamina

La triptamina se ha detectado en algunas plantas y también se ha demostrado que tras un período de latencia es activa en el test de curvatura de avena y de elongación de segmentos. Por otra parte, los tallos de tabaco pueden convertirse en AIA (7).

La primera etapa en esta cadena de reacciones es la descarboxilación del triptófano a triptamina catalizada por la triptófano descarboxilasa, es una enzima muy específica que actúa sobre la forma L-triptófano y no sobre la D-triptófano. Se ha encontrado que algunos tejidos como: tallos de tomate, de cebada, brotes de tabaco e hipocotilo de calabaza; y en tallos de tomate pueden separarse de la triptófano aminotransferasa. La desaminación oxidativa de la triptamina la realiza una aminoxidasa, se han aislado aminoxidasas en plántulas de guisantes y calabazas, todas ellas pocas especificadas (7).

c. Vía la Indolacetoxima

Esta vía es característica de la familia Brassicaceae. En el género *Brassica* se encuentra indolacetonitrilo, indolacetaldoxima y glucobrasicina. Estas tres sustancias son activas en promover el crecimiento en varios bioensayos. En todas las plantas ensayadas se demostró que indolacetaldoxima se convierte en AIA, mientras que en otros casos puede convertirse en destioglucobrasicina y glucobrasicina (7).

La enzima que cataliza *in vivo* el paso de triptófano a indolacetaldoxima no ha sido aislado, pero *in vitro* pueden actuar las peróxidas de rábano. El paso de indolacetaldoxima a indolacetonitrilo es catalizado por la indol-3-acetaldoxima hidrolasa, aislada de hojas de platanera. La conversión de glucobrasicina en AIA es catalizada por miroxinasa, aunque quizá esta transformación es poco importante, ya que la enzima es activa a pH 5.2 (7).

d- Vía del Triptofol

Es una modificación de la vía del indolpirúvico, y el triptofol aparece como una reacción lateral transitoria, es una vía importante, ya que aparece en muy pocas especies (7).

4.1.3.4 Biosíntesis de las Citocininas

Todos los datos que se poseen hoy día, indican que las citocininas se sintetizan en los ápices radicales. Así, hemos visto que se detectan en el contenido de los tubos de xilema y que su nivel disminuye si se someten las raíces a situaciones de adversidad o a bajas temperaturas (7).

Por otra parte, la cantidad de citocininas que se extraen de los ápices es mayor que la que se extrae de zonas más próximas a la raíz. En estaquillas o plántulas, las citocininas exógenas pueden, en algunos casos, sustituir a la raíz en la inducción del crecimiento o en algunas otras respuestas fisiológicas. Cuando se cultivan ápices de raíces de arroz en condiciones estériles, en el medio de cultivo aparecen citocininas. Vemos, por tanto, que las raíces, además de su papel como puerta de entrada a la planta del agua y nutrientes, tienen un papel importante como suministradores de citocininas al tallo (7).

Sin embargo no es esta toda la historia, y hay pruebas de que se pueden sintetizar citocininas en otros lugares de la planta. Se ha visto que hay plantas capaces de desarrollar frutos, aunque se corten las raíces de la base del tallo, lo que nos indica que el desarrollo de los frutos o incluso de las semillas que encierra no depende del suministro de citocinina que pueden realizar raíces, puesto que no existen en este caso. Parece que en el lugar donde puede realizarse esta síntesis de citocininas es en las semillas en desarrollo, ya que presentan una gran actividad de citocinina, cuando se valoran los extractos de las mismas. Por otra parte, se ha demostrado que los frutos partenocárpicos de tomate tienen un desarrollo más lento que frutos con semillas y, además, tienen un contenido en citocininas mucho más bajo (7).

a. Rutas Biosintéticas

Se tienen bastantes datos acerca de la biosíntesis de las citocininas aisladas a partir de t-ARN. Sin embargo, existe muy poca información en cuanto a la biosíntesis de citocininas libres. Se pensó que su origen sería t-ARN, pero para ello sería necesaria una hidrólisis del t-ARN hasta el nivel de mononucleótido para liberar la actividad de la citocinina. Esto sería posible en células senescentes, pero no en células vivas y activas. Además, se ha visto que la actividad de citocininas en ápices radiculares de guisantes es de orden 25 veces la actividad de citocinina de t-ARN, lo cual sólo se podría conseguir con un recambio muy rápido del t-ARN. Por otra parte, si el origen de las citocininas libres fuera éste, habría mayor abundancia de aquellas que integran la molécula del t-RNA y, sin embargo, no ha sido encontrada ninguna de ellas en forma libre. Aunque existen más pruebas que lo apoyan, creemos que estas son suficientes para deducir que hay una vía de biosíntesis de citocininas libres, distinta de la que siguen las del t-ARN, desconociéndose por el momento cuál es la ruta biosintética que lleva a la formación de citocininas (7).

Si las citocininas se sintetizan *de novo*, hay que plantear el problema de cual o cuales son los precursores. En principio, éstos podrían ser adenina, adenosina y ácido mevalónico, aunque éste cabe rechazarlo en el caso de las citocininas con anillo lateral. El problema de la biosíntesis de las citocininas es complejo no sólo por las bajas concentraciones en que se encuentran, sino por el papel central de la adenina en el metabolismo, con lo que al introducir adenina marcada como precursor sólo nos lleva a que una fracción pequeñísima de la misma sea incorporada en citocininas endógenas (7).

4.1.3.5 Interacción entre Auxina y Citocinina

La formación de brotes pudieron ser inducidos en tabaco, usando bajos niveles de auxinas y altos niveles de citocininas en el medio de cultivo. Muchos aspectos de diferenciación celular, organogénesis en tejido y cultivos de órganos, se fundamentan al ser controlada la interacción entre concentraciones de citocininas y auxinas (10).

Relativas proporciones de auxinas y citocininas no siempre producen resultados típicos, por ejemplo:

Brotos axilares que proliferan en algunas especies pueden ser promovidos por la presencia de una auxina juntamente con la citocinina (10).

Tejidos de monocotiledóneas pueden inducir a la formación de callos sólo con niveles altos de auxinas ya que las citocininas pueden ser innecesarias (10).

Organogénesis en monocotiledóneas puede ser promovida por la transferencia a otro medio de cultivo libre de auxinas, reduciendo las concentraciones de una alta actividad de auxinas como el 2,4-D o reemplazando el 2,4-D con otra auxina (ejemplo AIA o ANA) (10).

Un adecuado balance de auxinas y citocininas es más requerido para la formación de brotes adventicios y raíces. Las concentraciones de cada regulador difiere del tipo de planta, las condiciones del cultivo y los componentes usados; interacciones entre dos clases de regulantes son frecuentemente compuestas y más que una combinación de sustancias es probable para producir óptimos resultados (10).

4.1.4 Callos

Villalobos (25), (26) define el callo como un tejido obtenido por medio de aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una desdiferenciación celular, presentando estas células una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejido. Estudios microscópicos han demostrado que los tejidos de tipo callosos generalmente son heterogéneos en su composición celular, es decir, un mismo callo puede presentar varios tipos celulares.

Hurtado y Merino (13) opinan que una masa celular puede presentar diferentes tipos morfológicos, los cuales varían según su apariencia externa, textura y composición celular. Algunos callos son masas celulares compactas y duras, con células íntimamente unidas; mientras otras masas celulares forman tejidos esponjosos con una gran cantidad de espacios intercelulares.

Para Villalobos (25) y (26) una de las características más importantes del callo, desde el punto de vista funcional, es que a partir de células desorganizadas se tiene el potencial de desarrollar raíces, brotes y embriones dependiendo de la adición de auxinas y citocininas en el medio, de tal manera que el callo tiene potencial de formación de raíces (rizogénesis), formación de yemas (caulogénesis) y el proceso de desarrollo de un embrión completo y funcional a partir de una célula.

Para Vásquez (24) y Villalobos (25) dentro de los factores que influyen en el crecimiento del callo tenemos: medio de cultivo (sales minerales, vitaminas, carbohidratos, pH, reguladores de crecimiento y aditivos orgánicos), clase de tejidos y condiciones de incubación (luz y temperatura).

Hurtado y Merino (13) y Villalobos (25) indican que el éxito del cultivo de tejidos de plantas está muy influenciado por la composición química de los medios de cultivo. Se ha determinado que utilizando las sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas de nutrientes así como sus formas químicas adecuadas se han establecido cultivos para casi todas las partes de una planta en diversas especies vegetales.

4.1.5 Organogénesis

En contraste con la embriogénesis somática, la organogénesis comprende el desarrollo de yemas o de meristemos radicales a partir de los explantes directamente o a partir de los callos (14).

4.1.5.1 Aspectos Teóricos

El hallazgo del factor que promovía la división celular en preparaciones degradadas de ADN, identificado como cinetina, condujo a un estudio, en el que se demostró la importancia de las proporciones de auxina:citocinina en la determinación de la respuesta morfogénica *in vitro*. Una proporción alta de auxina comparada con la de citocinina favorecía la formación de raíces, mientras una proporción baja favorecía la formación de yemas. Por otra parte, la adición al medio de ciertos compuestos tales como la caseína hidrolizada (CH) modificaba la actividad reguladora de las proporciones de auxina:citocinina. Esto sugirió que el balance de ciertos factores afectaría el proceso de diferenciación y se considera como la base para el desarrollo de un medio definido en la organogénesis *in vitro* (14).

El término organogénesis *de novo* en el cultivo de tejidos se refiere a la diferenciación dentro del explante. Por ejemplo, a partir del floema externo de segmento de tallo de tabaco cultivado *in vitro* se desarrollan meristemos primarios (14).

Se han distinguido, morfológicamente, entre varios tipos específicos de callos de arroz, el que es capaz de producir organogénesis. Se ha informado que divisiones al azar de las células pueden dar como resultado la formación de hileras radiales del tejido; las regiones de mayor división celular forman meristemoides que hacen que el callo tenga una apariencia nodular (14).

4.1.5.2 Factores que Afectan la Organogénesis

Se han descrito ciertos factores que deben ser considerados para la manipulación exitosa de la organogénesis. Se incluyen factores relacionados con el explante (su edad fisiológica y ontogénica, su tamaño, el tejido u órgano del que es extraído) así como con el estado fisiológico de la planta madre y con la época del año que se realiza el cultivo (14).

Cualquiera de estos factores, o su combinación, puede afectar profundamente la respuesta morfogénica, y es necesario realizar una evaluación sistemática de tales efectos con el fin de establecer un sistema característico de experimentación (14).

4.1.5.3 Organogénesis Directa

Durante muchos años se han conocido sistemas mediante los cuales se pueden formar brotes directamente de una parte de la planta, sin la formación de callo; la propagación de la violeta africana (Saintpaulia sp.) a partir de explantes del pecíolo o de la base foliar, o la propagación de ciertas begonias a partir de explantes foliares son ejemplos que se recuerdan fácilmente. Los órganos o partes de plantas que contienen rudimentos de yemas o que tienen un potencial para la producción de meristemas adventicios llevan rápidamente a este enfoque (14).

4.1.5.4 Organogénesis Indirecta

En términos generales, en los cultivos de callos se inducen proliferaciones más o menos aleatorias, a partir de explantes tomados de varias partes de plantas, para formar brotes y raíces (14).

Este método de estimulación del desarrollo de órganos a partir de callos se basa en el trabajo, clásico de Folke, Skoog y sus colegas, especialmente Carlos Miller; que se realizó en los años 50 utilizando la cepa Winsconsin 38 de un cultivar de tabaco (Nicotiana tabacum). Los tejidos fueron expuestos a niveles predeterminados de una o varias clases de sustancias promotoras de la división celular (citocininas) y al AIA o a cualquiera de sus análogos sintéticos, tales como el ANA (14).

Nunca se debería dejar de recalcar el ímpetu que el descubrimiento de la primera adenilcitocinina químicamente identificada, la CIN, le dio a la tecnología del cultivo aséptico. Por primera vez los investigadores pudieron añadir al medio de cultivo combinaciones químicas conocidas, las auxinas y las citocininas, que podían estimular la división celular. Además, el manipular los niveles exógenos de CIN y auxina, pudieron fomentar el desarrollo del brote o de la raíz en los cultivos de callo (14).

Para quienes buscan la multiplicación de plantas de una manera estrictamente clonal, tal vez sea favorable que la ruta de la organogénesis indirecta no se comprenda bien, ya que ciertas evidencias sugieren que la formación de callos en estos sistemas constituyen a menudo la base para obtener variación genética e inestabilidad. Muchos investigadores recomiendan, por ello, que se evite este procedimiento en el clonaje aséptico de plantas. Por otra parte, quienes buscan utilizar la organogénesis indirecta por la vía de callo como un medio para fomentar la variación somaclonal y producir así un cambio deseado en el genotipo o la falta de conocimiento suficiente sobre la estimulación de la morfogénesis a partir de callos presumiblemente no diferenciados (14).

4.1.6 Embriogénesis Somática

En el período comprendido entre mediados de los años 50 y finales de esa década fue posible obtener, mantener y hacer crecer células aisladas de plantas. A finales de los años 50 y a principios de los 60, un estudio adicional sobre el cultivo de estas células en suspensión en medio líquido mostró que, en algunos casos, tales células podían formar embriones somáticos capaces de desarrollarse en plantas, y que en este sentido se comportaban como embriones cigóticos. Los procedimientos permitieron desviarse de los procesos sexuales normales y produjeron posteriormente una población de plantas con las características de la planta original de la cual derivaba el explante primario (14).

En diferentes especies vegetales ha sido posible obtener, a través de los años, el crecimiento exitoso de embriones somáticos hasta plantas enteras, como un procedimiento de laboratorio. Sin embargo, hasta el momento el número de especies así cultivadas ha sido relativamente bajo y sólo recientemente se han empezado a suministrar los medios que permitan competir con los métodos convencionales de propagación vegetativa (14).

Los procedimientos de embriogénesis somática no sólo son útiles para alcanzar una multiplicación práctica, sino que suministran posibilidades únicas para investigar: a) el estímulo que libera la totipotencialidad, que de otra manera estaría bloqueada, de las células maduras quienes según existan en el cuerpo de la planta intacta; y b) los factores que controlan la dirección y el ritmo del desarrollo posterior de la misma (14).

Como embriones somáticos, asexuales o adventicios se han definido los iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos. Son estructuras bipolares con un eje radica-apical, y no poseen conexión vascular con el tejido materno; las estructuras bipolares deben ser también capaces de crecer y formar plantas normales (14).

4.1.7 Variación Somaclonal

Está plenamente comprobado que ocurren modificaciones genéticas en las células y los tejidos cultivados *in vitro*. Muchas de estas modificaciones se manifiestan como mutaciones heredables a la progenie de las plantas regeneradas. Este fenómeno se conoce como variación somaclonal (14).

Las observaciones hechas indican que esta variación, que se recupera en las plantas regeneradas, resulta tanto de las diferencias genéticas que preexisten en las células somáticas del explante como de efectos inducidos por los componentes del medio de cultivo. Por consiguiente, la variación somaclonal puede usarse, con mucha frecuencia, para recuperar la variación genética natural de una variedad (14).

A diferencia de otros procesos de variación genética, se ha encontrado variación somaclonal en la progenie del 15% de las plantas regeneradas; la tasa de ocurrencia de mutaciones espontáneas, por ejemplo, es sólo de una en un millón (14).

La variación somaclonal es superior también al mejoramiento por mutaciones inducidas puesto que en las plantas regeneradas que derivan de células individuales, la ocurrencia de mosaico es mínima. En la mayor parte de los casos, por tanto, los somaclones pueden estabilizarse en una generación; las mutaciones, en cambio, requieren varias generaciones y retrocruces. La regeneración de plantas actúa como un filtro que elimina casi todos los cambios deletéreos; los cambios genéticos que interfieren con la regeneración de las plantas (por ejemplo, un bloqueo en el metabolismo primario), no pasan por variación somaclonal a las plantas regeneradas(14).

La variación somaclonal puede causar una variación temporal (epigenética) o una variación genética. Por definición, los cambios epigenéticos no se transmiten meióticamente, razón por la cual no son útiles en el fitomejoramiento. Una variación fenotípica tiene valor en el fitomejoramiento si proviene de una verdadera modificación del material genético, ya que una

variación celular puede provenir bien de una mutación, de un cambio epigenético o de una combinación de ambos procesos (14).

4.1.7.1 Causas y Manifestaciones

Es necesario entender los mecanismos que dan lugar a la inestabilidad genética durante el cultivo de tejidos, por razones de orden práctico. En primer lugar, la variación somaclonal es deseable para aumentar la ocurrencia de variabilidad en el mejoramiento de plantas; es, además, importante donde la uniformidad de las plantas obtenidas del cultivo de tejidos es esencial, como en la micropropagación rápida; es importante, en tercer lugar, para la conservación del germoplasma *in vitro*; y es necesaria, finalmente, para controlar el mecanismo que genera esa misma variación (14).

El origen de la variación no siempre es claro, y puede diferir entre una planta y otra. Puede ser, por ejemplo, un reordenamiento cromosómico, considerado el principal mecanismo que genera la variación somaclonal; puede deberse también a un entrecruce (crossin over) somático, a un intercambio de cromátidas hermanas, a una alteración de los nucleótidos por metilación, a una perturbación de la replicación de ADN por culpa de un depósito de nucleótido alterados, o también al silenciamiento o activación de genes por mutaciones ocurridas en regiones no codificadas (14).

El procedimiento general para buscar y seleccionar la variación somaclonal dentro de una variedad dada, es el siguiente: 1) regeneración de plantas a partir de callos; 2) crecimiento de las plantas en el invernadero hasta la madurez (plantas SC1) e identificación de las plantas SC1 fértiles (por la formación de flores, frutos y semillas); 3) identificación de líneas mejoradas respecto a caracteres específicos dentro de las plantas SC2, en el invernadero, y traslado al campo de muestras, duplicadas de semillas SC2, de los nuevos somaclones identificados; 4) pruebas de campo según un diseño experimental apropiado para evaluar la estabilidad de los somaclones; será necesario hacer selecciones en las plantas SC2, para comprobar la estabilidad hereditaria; 5) reintroducción de las nuevas líneas promisorias en el cultivo de tejidos, para explorar algún carácter adicional o para mejorar el comportamiento agronómico de un somaclón relacionado con ellas; éste último paso expresa el objetivo del uso de la variación somaclonal (14).

4.1.7.2 Potencial para el Mejoramiento de Plantas

Uno de los mayores beneficios de la variación somaclonal es la obtención de variabilidad genética en cultivares agroeconómicamente útiles, la cual se ha obtenido tradicionalmente recurriendo a la hibridación (14).

Los somaclones mutantes pueden enriquecerse durante el cultivo *in vitro* con las siguientes características: resistencia a enfermedades y a herbicidas, y tolerancia a estrés químico o ambiental. Además, la introgresión de genes de cultivares silvestres en especies cultivables es posible a juzgar por el reordenamiento de cromosomas observado hasta ahora en las plantas regeneradas *in vitro*. En general, esta técnica es relativamente sencilla, comparada con la del ADN recombinante, y es también una buena fuente de variabilidad genética; las plantas se pueden manipular fácilmente y se evalúan como parte de un programa de mejoramiento genético(14).

La variación somaclonal será muy útil para incorporar nuevas características a una variedad, o para modificar las que esta tiene; en efecto, la variabilidad genética inherente al somacultivo permite mejorar significativamente el valor agronómico de una especie cultivada (14).

En conclusión, el futuro desarrollo de la variación somaclonal depende del uso que hagan de ella los programas de mejoramiento y del establecimiento de una relación provechosa entre los investigadores del cultivo de tejidos, los genetistas y fitomejoradores (14).

4.1.8 Cultivo de Tejidos en Arroz

Uno de las mejores caminos y estrategias para el establecimiento de cultivos *in vitro* está expresado en la totipotencia, lo que es discutido actualmente. Aparentemente en cultivo de tejido de cereales, no todas la células expresan totipotencia. Generalmente la auxina 2,4-D es crítico en la regeneración de callos. De cualquier modo, la adición de citocinina puede ser significativo. Células meristemáticas de tejido inmaduro son objeto de la acción de los reguladores de crecimiento. Algunos genotipos producen cultivos embriogénicos, mientras que otros son recalcitrantes en la manipulación *in vitro*. La regeneración ocurre por embriogénesis somática o yemas adventicias y desarrollo de brotes con subsecuente enraizamiento.

Diferentes genotipos pueden diferenciarse en diferentes niveles de hormonas endógenas durante la morfogénesis (1).

4.1.8.1 Reguladores del crecimiento

Comúnmente el más usado en los cereales es el 2,4-D. Pero aún así el papel de las citocininas en conferir la regeneración de cereales no está claro (1).

Se ha reportado variación en la producción embriogénica de algunas variedades de arroz, usando 2,4-D y 2,4,5-ácido triclorofenoxiacético (2,4,5-T). El 2,4-D indujo callos embriogénicos en arroz; sin embargo el pCPA (ácido Clorofenoxiacético), entre otras auxinas probadas no fue efectiva (1).

Una adecuada combinación de auxinas y citocininas podría ser adecuada en la iniciación de callos embriogénicos de arroz (1).

En algunos cultivares se pueden regenerar plantas a través de callos iniciados con 2,4-D, mientras que en otras se da una iniciación sólo cuando el medio contiene citocininas.

La iniciación de callos regenerados a partir de 2,4-D, puede deberse a una hormona dentro de las plantas, en otras, requieren de citocininas para la formación de brotes. La cinetina ha tenido un buen efecto en algunos cultivares de arroz (1).

En varias variedades evaluadas mediante cultivos de callos de arroz, el ácido abscísico (ABA) incrementó la regeneración de plantas, también se reportó un incremento estimulante en la regeneración de plantas de arroz, usando ABA en el medio de cultivo. Bajas concentraciones de ABA aumentaron la embriogénesis en la inducción de callos de trigo (1).

4.1.8.2 Efectos del Genotipo

Se han presentado evidencias que en el cultivo de arroz, la habilidad de regeneración, está controlada por genes del núcleo y del citoplasma (1).

Las diferencias genéticas, pueden estar relacionadas con la variación de los niveles de hormonas endógenas. Aun explantes de un único genotipo, no responde idénticamente en el cultivo, debido principalmente a gradientes de hormonas endógenas (1).

Muchas de las diferencias genéticas pueden evitarse cultivando las plantas bajo óptimas condiciones, variando los nutrientes y hormonas en el medio de cultivo. Las diferentes concentraciones del medio y hormonas usado en cultivo de tejidos de cereales, agregan evidencias en las variaciones inherentes en el explante y entre genotipos (1).

La frecuencia de inducción de callos embriogénicos, la morfología, su relativa velocidad de crecimiento y regeneración de plantas, son influenciados por el genotipo, el medio de cultivo y la interacción genotipo y medio de cultivo. El genotipo es determinante en la respuesta en cultivo *in vitro* (1).

El balance entre planta y reguladores de crecimiento exógenos pueden alterar el balance en favor de la organogénesis y embriogénesis en lugar de un adecuado desarrollo (1).

Chu y Croughan, en 1990 (6), realizaron una investigación para determinar la influencia genética en la habilidad de regeneración de plantas en cultivo de panículas inmaduras de arroz, para lo cual utilizaron 10 cultivares, 12 híbridos F_1 con un arreglo dialélico 4 x 4, progenitores F_2 , F_3 y 24 retrocruzas, cultivados *in vitro*. Se encontró diferencias genotípicas en la habilidad de regeneración en los 10 cultivares. El cultivar Lemont presentó una alta habilidad en la regeneración de plantas, con un promedio de 8.58 plantas por panículas. En contraste con el cultivar *indica* IR36 el cual presentó una baja regeneración de plantas, con un promedio de 0.14 plantas por panícula. Algunos efectos aditivos no presentaron mayor importancia y la heredabilidad estimada fué baja, el mejoramiento de la habilidad de regeneración, a través de la hibridación no parece ser práctica, por lo que la mejor alternativa es identificar aquellos genotipos que presentan una alta habilidad regenerativa como Lemont o IRGA409.

Bregitzer, en 1992 (3), realizó una investigación, relacionada con el efecto del genotipo y del medio de cultivo en la regeneración de plantas y tipos de callos en cebada, para lo cual utilizó 15 genotipos y tres clases de medio (MS, B5 y CC), encontrando que la frecuencia de inducir callos, la morfología y callos embriogénicos friables, son influenciados por el genotipo, medio de cultivo y la interacción del genotipo y medio de cultivo.

4.1.8.3 Explante

Varios explantes pueden ser usados para iniciar una regeneración de plantas, entre los cuales los embriones inmaduros son muy usados en muchos cereales, incluyendo al arroz, trigo, sorgo, maíz, centeno y cebada (1).

Semillas maduras, embriones, anteras o polen y ápices de la raíz pueden ser usados exitosamente en arroz (1).

La sensibilidad a hormonas y la naturaleza de las células, son probablemente determinados por el nivel de hormonas endógenas en las células. La razón por la cual las citocininas no son requeridas en la inducción en algunos callos de arroz, puede ser debido a los niveles de citocininas presentes en el explante. Esta diferencia genotípica puede ser debido a la variación de niveles de hormonas endógenos observados en arroz. Así las bases genéticas de variabilidad en respuesta al cultivo de tejido y a la morfogénesis es principalmente debido a diferencias en el metabolismo hormonal dentro del explante el cual es estabilizado por el nivel del gen, expresado por hormonas individuales conjuntamente con el genotipo (1).

Se podría decir entonces que todos los genotipos son capaces de producir cultivos embriogénicos, y el correcto explante meristemático expuesto a un adecuado regulador de crecimiento, pueden ser crítico (1).

4.1.8.4 Vía Morfogenética

La regeneración de plantas ocurre vía organodiferenciación, embriogénesis somática o ambas. La organogénesis en la formación de raíces, raras veces dirigen a plantas viables, mejorando brote-formación pueden ser capaces de producir plantas viables y un enraizamiento subsecuente. La regeneración de plantas vía embriogénesis somática es preferible a la organogénesis, debido a que usualmente surgen embriones provenientes de una célula y de esta manera la manipulación genética podría ser transportada a generaciones siguientes (1).

La ocurrencia de organogénesis y embriogénesis somática de algunos explantes sugieren la cuestión de relación entre dos eventos (1).

Algunos cultivos producen callos embriogénicos con bajas concentraciones de cinetinas. Extendiéndose ese experimento a aislar regiones nodales, con el meristemo apical, producción de callos embriogénicos de algunos explantes con bajos niveles de citocinina y estructuras de yemas verdes con altos niveles de citocininas. Las citocininas exógenas no son requeridos en todos los casos, probablemente porque algunos tejidos presentan niveles adecuados de estas. Donde no se contiene un nivel adecuado, pueden ser suplantados con citocininas exógenas (1).

4.1.8.5 Tipos de Células

Una distintiva característica de células embriogénicas en los cereales, se encuentra en el color y la morfología de la superficie (1).

La apariencia compacta, callos nodulares blanco lechosos o amarillo, es la primera indicación visible de callos embriogénicos desarrollados en los cereales. Los callos no embriogénicos son poco compactos cristalinos y de color amarillo a café, son capaces de distinguir entre callos embriogénicos y no embriogénicos de arroz, por la diferencia en la iniciación, del brote y baja frecuencia del tipo de callo no embriogénico (1).

4.1.8.6 Embriogénesis Somática en Arroz

No está claro en las investigaciones realizadas sobre la formulación óptima en el medio de cultivo para producir embriogénesis somática. Los medios MS, LS y N6 se han utilizado casi con igual regularidad. Se ha utilizado el 2,4-D como regulador de crecimiento en las plantas en un rango de 0.5 a 3 mg/l. Más recientemente se han logrado desarrollar embriones somáticos a partir de callos del epitelio escutelar. Esta técnica particular extiende el rango del genotipo receptivo y lo transforma más allá de esos que pueden ser regenerados de protoplastos (20).

4.1.8.7 Maduración del Embrión Somático de Arroz

La embriogénesis somática continúa por una serie de divisiones al azar de células terminales hasta producir un embrión globular. Después el embrión globular puede producir aproximadamente 32 células, un protoderma diferenciado. Al seguirse cultivando, se achata en el ápice durante el desarrollo del escutelum. El coleoptilo y el meristemo apical se diferencian lateralmente. Sigue la diferenciación del meristemo apical de la raíz y varias hojas primordiales.

Los embriones somáticos maduran alrededor de los 28 días de haber sido cultivados y pueden germinar al ser transferidos a un medio con baja concentración de 2,4-D (20).

Los embriones somáticos maduran sobre medios suplementados solamente con 2,4-D muchos almacenan proteína y lípidos acumulados durante la embriogénesis somática. Más bioquímicamente los embriones somáticos pueden ser obtenidos, mediante la implementación en el medio de cultivo, durante la fase de maduración, con ácido abscísico o la incrementación osmótica (20).

Por ejemplo la lectina del arroz (una proteína que se acumula durante la embriogénesis zigótica retrasada), puede ser aislada en un medio MS suplementado con ABA (10 μ M) y la adición de sacarosa o manitol (0.29 M). Obviamente por la manipulación del medio durante el desarrollo del embrión cigótico, es posible obtener embriones somáticos casi bioquímicamente idénticos al embrión cigótico (20).

4.1.8.9 Variación Somaclonal en Arroz

La variación ocurrida en líneas somaclonales de arroz y la herencia de tal variación han sido estudiadas por diversos investigadores. La evidencia obtenida por ellos indica que para caracteres de gran importancia económica como la altura, la habilidad de macollamiento, la floración, y la fertilidad del grano se puede generar variación heredable por la vía del somacultivo (14).

El trabajo se realizó en el CIAT y tuvo dos objetivos: primero, evaluar el potencial de la variación somaclonal para mejorar algunas variedades comerciales de arroz, y segundo, determinar los caracteres de importancia económica que pueden variar por la vía somaclonal y sus frecuencias de variación (14).

Se evaluaron progenies somaclonales de ocho variedades comerciales de arroz sembrada en América Latina; CICA 8, Oryzica 1, IRGA 409, IAC 165, Bluebelle, BG 90-2, Oro, Diamante, y la línea CY 6513-7Ca-1 del programa de Arroz del CIAT (14).

Los callos se indujeron sobre el medio básico Murashige y Skoog (1962) suplementado con 1,360 mg/l de extracto de levadura, 300 mg/litro de caseína hidrolizada, 1.5 g/l de Gelrite, 60 g/l de azúcar, 2 mg/l de 2,4-D, 2 mg/l de ANA, 3 mg/l de cinetina, 2 mg/l tiamina, 2 mg/l de glicina, 0.5 mg/l de piridoxina, y 0.5 mg/l de ácido nicotínico (14).

La regeneración de plántulas se logró sobre el medio MS suplementado con 100 mg/l de inositol, 1.5 mg/l de Gelrite, 30,000 mg/l de sacarosa, 1 mg/l de ANA, 4 mg/l de cinetina, 3 mg/l de tiamina, 2 mg/l de glicina, 0.5 mg/l de piridoxina y 0.5 mg/l de ácido nicotínico (14).

Se obtuvieron 5,425 líneas somaclonales provenientes de igual número de plantas regeneradas. Los mayores porcentajes de variación se observaron en los caracteres vigor inicial, floración, altura, macollamiento y centro blanco. Se encontró un intenso efecto del genotipo donador en la frecuencia de variación de características como la floración, la altura y el macollamiento (14).

De este estudio sobre la variación somaclonal de arroz se pueden extraer las siguientes conclusiones (14):

- La incidencia del centro blanco de la semilla presentó un alto porcentaje de variación en los somaclones si se compara con esa incidencia en los genotipos donantes.
- Los mayores porcentajes de variación de las características agronómicas de las líneas somaclonales se hallaron (en ese orden) en la floración, la altura, el macollamiento y el vigor inicial.
- Existe influencia del genotipo en la variación generada dentro de las líneas somaclonales para características como la floración, la altura de la planta y el macollamiento.

Los resultados observados indican que la variación somaclonal es una fuente potencial importante de variabilidad genética (14).

4.1.9 Pruebas de significación de las diferencias entre los tratamientos

Cuando se tienen varios tratamientos, se presenta el problema de hacer la comparación de las medias de los tratamientos, a fin de discriminar variables y clasificar los tratamientos para elegir el mejor si es necesario (18).

Con los datos del análisis de varianza se hace las pruebas de significancia de las diferencias o las comparaciones entre las medias de los tratamientos. Para ello, existen varios métodos, entre ellos tenemos los siguientes (18):

- a) Prueba de "t".
- b) prueba de Tukey.
- c) Prueba de Duncan.
- d) Contrastes ortogonales.

4.1.9.1 Prueba de "t"

Esta prueba se aplica cuando la prueba de "F" es significativa, cuando las comparaciones entre medias son independientes y se han planeado dichas comparaciones antes de que los datos sean examinados. El número de comparaciones independientes (también llamadas ortogonales) que se pueden hacer al igual a $a - 1$ o al número de grados de libertad para los tratamientos. Con a tratamientos se puede obtener $a(a - 1)/2$ diferencias o comparaciones múltiples, pero no todas son independientes (18).

Se dice que las comparaciones son independientes cuando cada media aparece únicamente en una comparación (18).

Para hacer la prueba de "t" se pueden seguir dos métodos (18):

1. Hacer comparaciones múltiples calculando una diferencia mínima significativamente común (D. M. S.) con la siguiente fórmula:

$$D.M.S. = t_{\alpha}(\text{G. L. del error}) \sqrt{\frac{2S^2}{n}}$$

donde:

t_{α} (G. L. del error) indica el valor de t .

La tabla de t es obtenida con el nivel de significancia y el número de grados de libertad del error.

S^2 = Varianza o cuadrado medio del error experimental, y

n = número de repeticiones o número de valores necesarios para calcular los promedios en estudio.

a) Dos promedios son estadísticamente distintos si su diferencia es mayor que D.M.S.:

$$D > D. M. S.$$

b) Dos promedios son estadísticamente iguales, su diferencia estima a cero, si su diferencia es menor que la D.M.S.:

$$D < D.M.S$$

2. Planear comparaciones independientes. Éstos es el mejor método y consiste también en calcular una D.M.S., pero para cada comparación.

$$D.M.S. = t_{\alpha}(\text{G. L. del error}) \sqrt{\frac{S^2}{n} + \frac{S^2}{n}}$$

Aplicable si $n_1 = n_2$

o si $n_1 \neq n_2$

n indica el número de valores usados para calcular los promedios, y t y S^2 son valores indicados anteriormente (18).

Las mismas reglas descritas se emplean para determinar la significancia de las diferencias (18).

4.1.10 Superficie de respuesta

4.1.10.1 Diseño de primer orden

Si todos los factores representan variables cuantitativas; como tiempo, temperatura, cantidad de nitrógeno, etc., es natural pensar en los rendimientos o respuesta de y como una función de los niveles de estas variables. Se puede describir:

$$Y_u = \phi(x_{1u}, x_{2u}, \dots, x_{ku}) + e_u$$

donde $u = 1, 2, \dots, N$, que representa las N observaciones en el experimento factorial y x_u representa el nivel de i -ésimo factor en la u -ésima observación. A la función ϕ se le llama superficie de respuesta. El residuo e_u mide el error experimental de la u -ésima observación. Un conocimiento de la función ϕ da un resumen completo de los resultados del experimento y permite predecir las respuestas para valores de las x_{iu} que no fueron probados en el experimento (5).

Cuando no se conoce la forma matemática de los ϕ , la función puede aproximarse satisfactoriamente dentro de la región experimental por un polinomio de las variables x_{1u} (5).

Se debe tener precaución ya que los polinomios de superficie de respuesta tiene la gran ventaja de que son fáciles de ajustar (5).

4.1.10.2 Diseño de segundo orden

a) La superficie de respuesta cuadrática

La forma general de un polinomio cuadrático (segundo grado), se ilustra por medio de una ecuación para dos variables x :

$$Y_U = \beta_0 + \beta_1 x_{1u} + \beta_2 x_{2u} + \beta_{11} x_{1u}^2 + \beta_{22} x_{2u}^2 + \beta_{12} x_{1u}x_{2u} + e_u$$

La superficie contiene términos lineales en x_{1u} , x_{2u} , términos al cuadrado en x_{1u}^2 , x_{2u}^2 , y términos de productos cruzados $x_{1u}x_{2u}$ (5).

Para estimar los coeficientes de regresión en este modelo, cada variable x_{1u} debe tomar cuando menos tres diferentes niveles. Esto sugiere el uso de diseños factoriales de la serie 3^k . Sin embargo una desventaja de la serie 3^k es que, con más de tres variables x , los experimentos son grandes, aunque esta dificultad puede reducirse por el uso de la repetición fraccionada. Más aún, los coeficientes β_{11} y β_{22} de los términos cuadrados se estiman relativamente con baja precisión en un factorial (5).

Algunos autores desarrollaron nuevos diseños, concretamente para ajustar superficies de respuesta de segundo orden. Sus primeros diseños, llamados diseños compuestos, se construyen por adición de más combinaciones de tratamientos a aquellas que son obtenidas de un factorial 2^k . De ello tenemos diseños compuestos centrales y diseños compuestos no centrales (5).

b) Simplificación de la superficie cuadrática

Cuando se ha ajustado la superficie cuadrática, la posición de valores máximos de \hat{y} , si existe, se encuentra diferenciado con respecto a cada x . Con tres factores la superficie es (5):

$$\hat{Y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3$$

$$\delta y = b_1 + 2b_{11}x_1 + b_{12}x_2 + b_{13}x_3 = 0$$

$$\delta x_1$$

$$\delta y = b_2 + b_{12}x_1 + 2b_{22}x_2 + b_{23}x_3 = 0$$

$$\delta x_2$$

$$\delta y = b_3 + b_{13}x_1 + b_{23}x_2 + 2b_{33}x_3 = 0$$

$$\delta x_3$$

Algunas transformaciones de las variables x simplifican el trabajo para un estudio adicional de la superficie de respuesta. El origen de las coordenadas x puede transferirse al punto estacionario haciendo las transformaciones (5):

$$X_1' = x_1 - x_{1s}; \quad X_2' = x_2 - x_{2s}; \quad X_3' = x_3 - x_{3s}$$

Con esta sustitución, los términos lineales desaparecen de la expresión cuadrática, la cual se transforma, para tres factores en (5):

$$\hat{Y} = \hat{Y}_s + b_{11}X_1'^2 + b_{22}X_2'^2 + b_{33}X_3'^2 + b_{12}X_1'X_2' + b_{13}X_1'X_3' + b_{23}X_2'X_3'$$

donde

$$\hat{Y}_s = b_0 + \frac{1}{2}(b_{11}x_{1s} + b_{22}x_{2s} + b_{33}x_{3s})$$

Es el valor de estimación estacionario \hat{Y} .

Los términos de productos cruzados también pueden anularse transformando en nuevas variables X_i , que son funciones lineales ortogonales de las x_i . Esta transformación es familiar en geometría y álgebra. En geometría, la transformación consiste en girar los ejes coordenados, de tal manera que los ejes principales de la superficie cuadráticas transformen en los ejes coordenados. En álgebra, la transformación reduce la expresión cuadrática en su forma canónica (5).

En las nuevas variables, la superficie de respuesta se transforma a:

$$\hat{Y} = \hat{Y}_s + \lambda_1 x_1'^2 + \lambda_2 x_2'^2 + \lambda_3 x_3'^2$$

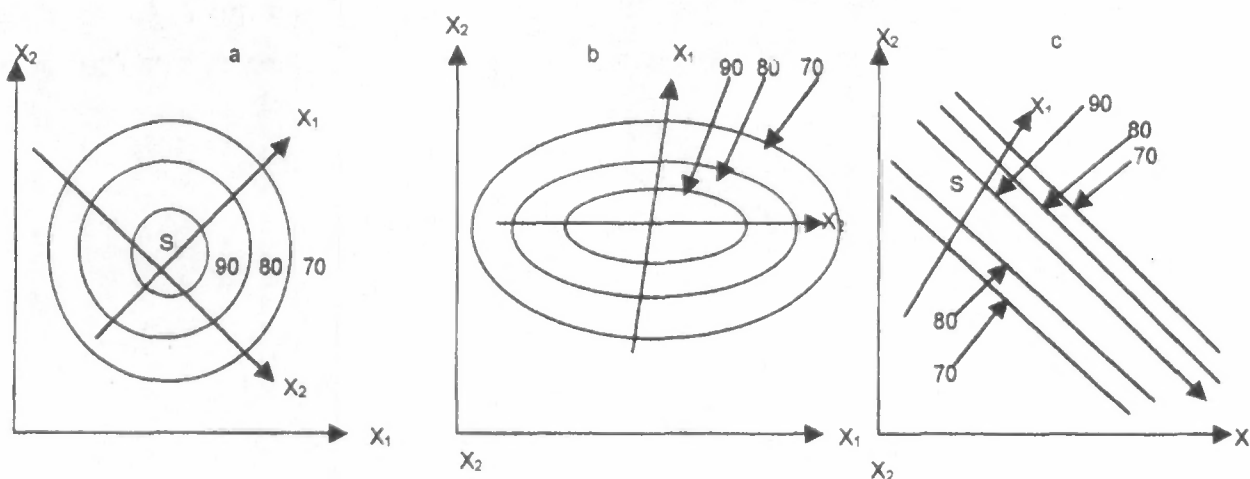
Donde los λ_i son funciones de la b y la X_i son combinaciones lineales de las x_i (5).

c) Interpretación y experimentación adicional

Una representación gráfica de la superficie cuadrática ayuda a interpretar los resultados. Si hay solamente dos factores, una serie de líneas de contorno pueden dibujarse en gráficas, como lo muestra la figura 1. Cuando λ_1 y λ_2 son negativas, estos contornos son elipses; el punto S es la combinación óptima de x_1 y x_2 . La figura 1a, muestra una superficie en la cual λ_1 y λ_2 son casi iguales; en la figura 1b λ_1 es mucho más pequeña que λ_2 . La forma límite de la figura 1b, en la cual λ_2 tiende a cero, se muestra en la figura 1c. En este caso, la respuesta sigue siendo la misma cuando hay movimiento a lo largo de cualquier línea $x_1 = \text{constante}$. En particular, la respuesta máxima puede obtenerse por cualquier combinación de valores x_1 y x_2 que haga $X_1=0$. Se ha llamado a este tipo de superficie una *loma estacionaria* (5).

Con dos variables, los contornos obtenidos de la primera superficie cuadrática pueden aparecer como en la figura 1 d o e. El caso e, en el cual λ_2 es casi cero, ha sido llamado *loma ascendente* y recomienda un movimiento a lo largo del eje X_2 en la dirección en la cual la respuesta de predicción se incrementa (5).

Algunas λ_i son positivas y otras son negativas. Esta variable, ilustrada para dos factores en la figura 1f, se llaman *minimas*, siendo un mínimo para algunas de las variables x y un máximo para otras. Si este caso apareciera, se espera que la respuesta se incrementa más rápidamente a medida que se incrementa la X_i que tiene la más alta λ_i positiva. Pueden aprobarse combinaciones de factores que den varios valores incrementados de esta X_i (5).



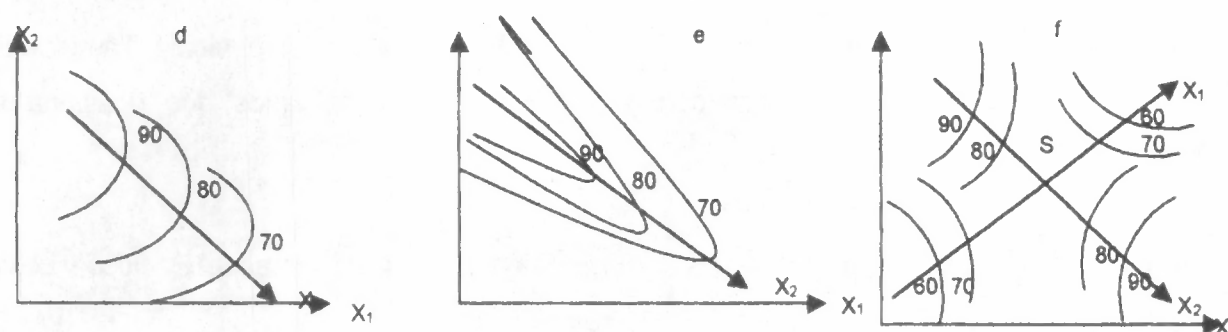


FIGURA 1. Diferentes tipos de contorno de superficies.

4.2 MARCO REFERENCIAL

4.2.1 Ubicación del experimento

El experimento se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), el cual se encuentra ubicado en el kilómetro 21.5 de la carretera a Amatitlán, Bárcena, Villa Nueva, Guatemala.

4.2.2 Variedades Evaluadas

4.2.2.1 ICTA COLOMGUA

La variedad ICTA COLOMGUA, con pedigrree CT9807-3-5-1-2-M-MI-MI-1C, se originó del cruzamiento triple realizado en el CIAT, Colombia (1988), entre el progenitor femenino CT 9317 (P4278-F2-80-4-1X/TOX 1768-1-2-1) y la línea experimental CT 3059-F4-79-1-1B, que fungió como progenitor femenino (17).

Presenta un vigor vegetativo intermedio o normal y buen macollamiento (9 a 15 macollas por planta). La altura promedio es de 99 cm con rango de 93 a 112 cm. Los tallos son fuertes, resistentes al vuelco y las hojas de color verde intenso, pubescentes. La hoja bandera es de posición semierecta y sobresale por encima de la espiga. La floración ocurre entre los 77 y 95 días y la madurez fisiológica entre los 114 y 127 días, a partir de la fecha de siembra. La densidad

de las panículas es intermedia y su longitud de 23 a 25 cm. El grano es largo, pubescente, sin arista (17).

Es resistente a *Piricularia* (*Pyricularia oryzae*) en la hoja y cuello de la panícula. También es resistente a helmintosporiosis, falso carbón y al complejo de patógenos que ocasiona el manchado del grano (17).

Es una variedad de amplia adaptación a las zonas arroceras del Litoral del Pacífico y costa atlántica de Guatemala (17).

4.2.2.2 MPI 116

Línea mutante proveniente de la variedad Precoz-ICTA, la cual se origina de una selección de BR-IRGA 409 correspondiente al cruzamiento IR 930-2/IR665-31-2-4 (4). Esta línea mutante fue desarrollada por el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA) y la Dirección General de Energía Nuclear (DGEN). Se diferencia de la variedad original por ser glabra. Actualmente se encuentra siendo evaluada a nivel nacional para confirmar su reacción a enfermedades, su potencial de rendimiento y aceptación de los agricultores.

4.2.2.3 LA43

Es una línea mutante proveniente de la variedad Lemont, que a su vez proviene del cruzamiento Lebonnet//C.I. 9881/IR 659-10-8-3 (4). La línea mutante fue desarrollada en el Instituto Agronómico Campinas de Sao Pablo, Brasil. Sus principales características mejoradas en relación a la variedad original son: resistencia a *Piricularia*, añublo de la vaina y alta calidad molinera.

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

- 5.1.1 Regenerar plántulas de arroz utilizando tejido no diferenciado (callo) proveniente de embriones maduros.

5.2 ESPECIFICOS

- 5.2.1 Determinar la combinación de reguladores de crecimiento que regenere la mayor cantidad posible de plantas verdes.
- 5.2.2 Determinar el genotipo que presenta la mayor frecuencia de regeneración de plantas verdes.

7. METODOLOGIA

7. 1 Análisis Estadístico

7.1.1 Diseño Experimental

Los tratamientos evaluados fueron 57, consistentes en la combinación de 19 combinaciones de citocininas (BAP y cinetina) y auxina (ANA), y tres genotipos, cada tratamiento se repitió 10 veces por tratamiento, haciendo un total de 570 unidades experimentales para los tres genotipos.

Para determinar la existencia de diferencias significativas en las respuestas de los factores evaluados, se utilizó la prueba de "t" de student. El análisis de regresión múltiple tipo superficie de respuesta para cada combinación de citocinina y auxina, fue utilizado para poder predecir con que combinaciones de reguladores del crecimiento se puede incrementar un poco mas la respuesta de las variables analizadas.

Para cada genotipo (ICTA COLOMGUA, MPI-116 y LA-43), los tratamientos quedaron de la siguiente manera:

Cuadro 1. Tratamientos y niveles de reguladores del crecimiento

TRATAMIENTO	CINETINA (mg/l)	ANA (mg/l)
T ₀	0	0
T ₁	3	0.25
T ₂	3	050
T ₃	3	0.75
T ₄	4	0.25
T ₅	4	050
T ₆	4	0.75
T ₇	5	0.25
T ₈	5	050
T ₉	5	0.75
T ₁₀	0.2	0.25
T ₁₁	0.2	050
T ₁₂	0.2	0.75
T ₁₃	1	0.25
T ₁₄	1	050
T ₁₅	1	0.75
T ₁₆	2	0.25
T ₁₇	2	050
T ₁₈	2	0.75

7.1.2 Modelo Estadístico

Para el análisis tipo superficie de respuesta se tiene el siguiente modelo estadístico:

- a) Para el caso donde se analizó al GENOTIPO-CINETINA-ANA, el modelo estadístico quedó de la siguiente manera (5):

$$Y_{ij} = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_1^2 + b_4 x_1 x_2 + b_5 x_2^2 + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij}	= Valor de la variable de respuesta.
b_0	= Intercepto en el eje Y.
b_1 y b_3	= Pendiente del nivel de cinetina.
b_2 y b_5	= Pendiente del nivel de ANA.
b_4	= Pendiente de la interacción cinetina x ANA.
x_1	= Nivel de cinetina.
x_2	= Nivel de ANA.
E_{ij}	= Error asociado a la ij-ésima unidad experimental.

- b) En el otro caso donde se analizó GENOTIPO- BAP-ANA, el modelo estadístico que se utilizó fue el siguiente (5):

$$Y_{ij} = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_1^2 + b_4 x_1 x_2 + b_5 x_2^2 + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij}	= Valor de la variable de respuesta.
b_0	= Intercepto en el eje Y.
b_1 y	= Pendiente del nivel de BAP.
b_2 y b_5	= Pendiente del nivel de ANA.
b_4	= Pendiente de la interacción BAP x ANA.
x_1	= Nivel de BAP.
x_2	= Nivel de ANA.
E_{ij}	= Error asociado a la ij-ésima unidad experimental.

7.1.3 Unidad experimental

La unidad experimental estuvo constituida por un tubo de cultivo de 150 x 25 mm, al cual se le agregó 10 ml del medio de cultivo. Se cultivó un callo por tubo de cultivo, para lo cual se tuvieron que producir previamente 190 callos por genotipo, sembrándose un total de 570 callos.

7.1.4 Toma de datos de las variables de respuesta

Para todas las variables de respuesta que se presentan a continuación, los datos fueron tomados a las seis semanas después de haberse trasladado los callos al medio de regeneración de plantas.

7.1.4.1 Regeneración de plantas verdes

Se contó, en cada unidad experimental que contenía callos, el número de plantas verdes que se formaron de cada callo.

7.1.4.2 Número de brotes por callo

De cada callo que presentaba plantas verdes, se generaron varios brotes, por lo que para cada unidad experimental se anotó el total de brotes generados.

7.1.4.3 Longitud de brotes

De esta variable se midió en centímetros, la longitud de cada brote generado en cada unidad experimental, tomándose este dato desde la base del brote hasta el ápice de la hoja más grande, luego se obtuvo un promedio para cada tratamiento.

7.1.4.4 Albinismo

Se revisó cada unidad experimental para anotar el número de plantas que presentaban albinismo.

7.1.5 Análisis de la Información

Para el procesamiento de las variables de respuesta de la investigación, los resultados se analizaron por orden de importancia respecto a los objetivos específicos que se quería alcanzar. Mediante una prueba de "t" de student se compararon pares de medias de los tres genotipos para cada variable de respuesta por separado y mediante un análisis de regresión múltiple tipo superficie de respuesta se analizó en forma separada cada genotipo y cada variable de respuesta.

Previo al análisis de los datos se realizó una prueba de normalidad para determinar si cada tratamiento tenía una distribución normal.

7.1.6 Presentación de la Información

La información de los resultados, fue presentada en forma de gráficas y tablas.

7.2 Manejo del experimento

7.2.1 Selección de las variedades

La selección de las variedades de arroz, se llevó a cabo tomando en cuenta el interés de la Subárea de Mejoramiento de Arroz del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA). Las variedades seleccionadas fueron las siguientes:

ICTA COLOMGUA

MPI 116

LA43

7.2.2 Medio de Cultivo

El medio de cultivo que se utilizó tanto para la inducción de callos, como para la regeneración de plantas de arroz, fue el de Murashige y Skoog (MS), variando únicamente las diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento.

7.2.2.1 Preparación de las Soluciones Madre (14)

a. **Sales:** Se disolvieron independientemente los pesos de cada sal en 200 ml de agua destilada.

- NH_4NO_3	35.0 g
- KNO_3	40.0 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	9.0 g
- KH_2PO_4	3.5 g
- H_3BO_3	0.1 g
- $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
- KI	0.02 g
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.005g

Se pesaron 5 mg (0.005g) de las siguientes sales:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Se disolvieron conjuntamente en 10 ml de agua destilada y se tomó 1 ml para 200 ml de agua destilada.

Se mezclaron las diez soluciones anteriores para conseguir 2 litros de concentrado de sales.

b. MgSO_4

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.7 g en 100 ml de agua destilada

c. Hierro

- Na_2EDTA 0.75 g

- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.55 g

Se disolvió el $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 20 ml de agua destilada y el Na_2EDTA en 20 ml de agua destilada a medida que se calentó. Se mezcló el $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y el Na_2EDTA ; se dejó enfriar y se agregó agua hasta completar 100 ml.

d. Vitaminas

- Tiamina HCl 20 mg
- Glicina 100 mg
- Acido nicotínico 25 mg
- Piridoxina HCl 25 mg

Se disolvió cada vitamina hasta completar 500 ml con agua destilada. Se colocaron 10 ml de la solución de vitaminas en pequeños envases y se mantuvieron congelados. Se usaron 10 ml por cada litro de medio.

Para preparar 1 litro del medio básico Murashige y Skoog (MS), se mezclaron las soluciones concentradas, ya descritas anteriormente, en las siguientes proporciones:

Cuadro 2. Cantidad de soluciones madre para preparar un litro de Medio Murashige y Skoog (MS) (14).

No.	Componente	Cantidad en el medio
1	Sales	100 ml
2	MgSO ₄	10 ml
3	Hierro	5 ml
4	Vitaminas	10 ml
	PH 5.8	

Se esterilizó en autoclave a 121°C, durante 15 minutos, a una presión de 103.4 kP (15 libras por pulgada cuadrada).

7.2.2.2 Preparación del Medio de Cultivo para Inducción de Callos

En la inducción de callos de arroz, se utilizó el medio MS (cuadro 2), suplementado con 2 mg/l de 2,4-D, 0.5 mg/l de cinetina, 100 mg/l de myo-inositol, 1,000 mg/l de caseína hidrolizada, 40,000 mg/l de sacarosa y 8,000 mg/l de agar.

Teniendo esterilizadas las cajas de petrí, se sirvió en las cámaras de flujo laminar, aproximadamente 25 ml por caja petrí.

El medio fue almacenado en un cuarto frío a 4 °C, para su conservación mientras no estuvo en uso.

7.2.2.3 Preparación del Medio de Cultivo para Regeneración de Plantas

Para la regeneración de plantas, también se utilizó el medio de Murashige y Skoog (MS), mencionado anteriormente, suplementado con 30,000 mg/l de sacarosa, 8,000 mg/l de agar y los siguientes niveles de reguladores del crecimiento:

Cuadro 3. Niveles aplicados de reguladores de crecimiento por variedad.

REGULADORES DE CRECIMIENTO	NIVELES (mg/l)
CINETINA (CIN)	0
	3
	4
	5
BENCIL AMINOPURINA (BAP)	0
	0.2
	1
	2
ACIDO NAFTALENACETICO (ANA)	0
	0.25
	0.50
	0.75

El medio fue servido en tubos de cultivo de 150 x 25 mm, en aproximadamente 10 ml por tubo y luego fueron esterilizados en la autoclave

Este medio, mientras no fue utilizado, se almacenó en un cuarto frío a 4 °C, para su conservación.

7.2.3 Trabajos en Cámara de Flujo Laminar

7.2.3.1 Desinfección de la Semilla de Arroz

Previo a desinfectar la semilla, se le quitó la testa en forma manual para no dañar al embrión y posteriormente fue desinfectada en la cámara de flujo laminar, usando alcohol etílico al 70% durante 20 segundos e hipoclorito de sodio al 2.5% durante 10 minutos. Se lavó la semilla tres veces con agua esterilizada en cada desinfección.

7.2.3.2 Inducción de Callos de Arroz

Para la inducción de callos, las semillas de arroz fueron colocadas en el medio de inducción MS, contenido en cajas de petrí, en un número de 10 semillas por caja petrí.

Las cajas petrí, fueron guardadas bajo obscuridad total a 25 °C, en una cámara de crecimiento durante 30 días.

7.2.3.3 Obtención de los Callos

Después de los 30 días, se separó el callo formado de la semilla y se seleccionaron callos homogéneos, basados en su apariencia compacta, secos y blancos, para que posteriormente fueran transferidos al medio de regeneración.

7.2.3.4 Regeneración de Plantas Verdes

Los callos formados fueron transferidos al medio de regeneración MS que se encontraba en los tubos de cultivo (un callo por tubo de cultivo).

Estos tubos fueron puestos bajo iluminación durante 16 horas, a 25 °C, en un cuarto de crecimiento, para dar paso a la formación de plantas verdes.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al realizar la prueba de normalidad se determinó que por la presencia de muchos tratamientos que no presentaron regeneración de plantas (ver cuadro 25A), estos no podían ser analizados a través de un análisis de varianza, por lo que los resultados presentados y su discusión se basan en los promedios obtenidos de cada tratamiento y de su comparación a través de pruebas de "t" de Student al 5 % de significancia estadística. Además, se realizó un análisis de regresión múltiple tipo superficie de respuesta, con el cual se predicen los posibles rangos de reguladores del crecimiento para aumentar la respuesta de las variables medidas.

8.1 Obtención de Plantas Verdes

Cuando los callos que se formaron tuvieron el tamaño deseado, se seleccionaron aquellos que tenían las características deseadas (friables, secos, etc). Luego, fueron separados del grano de arroz y posteriormente fueron transferidos a tubos de cultivo que contenían el medio de regeneración de plantas (ver detalles de este medio en la metodología), en donde primeramente algunos formaron puntos verdes, otros no presentaron ninguna coloración y otros únicamente presentaron una coloración oscura. De los que presentaron puntos verdes, empezaron a emerger las plantas que presentaban la coloración verde. A otros sólo le crecieron raíces y otros no presentaron ni raíces ni plantas.

8.2 Plantas Albinas

Las plantas albinas son aquellas que por trastornos genéticos no contienen clorofila, por lo que son indeseables en cultivo de tejidos ya que no pueden fotosintetizar para desarrollarse y adaptarse adecuadamente.

Esta variable de respuesta se tenía contemplada incluirse en este análisis, pero a las seis semanas en que fueron tomados los datos, en ningún tratamiento se obtuvieron plantas que no presentaban clorofila (plantas albinas), es decir, que todas las plantas presentaron la pigmentación verde que las hace deseables en un trabajo de cultivo de tejidos para su desarrollo y crecimiento, tanto a nivel del laboratorio como en los invernaderos y posteriormente al ser transferidas al campo para su observación.

8.3 Variable Porcentaje de Regeneración

El porcentaje de regeneración de plantas verdes obtenido en cada una de las 18 combinaciones de reguladores del crecimiento y del testigo se muestran en el cuadro.

También se presenta la similitud o diferencia entre tratamientos, basado en la agrupación obtenida mediante la prueba de comparación de medias.

Puede observarse que se presentan seis diferentes agrupaciones en los tratamientos evaluados y que los siete primeros tratamientos presentaron los mayores porcentajes de regeneración, los cuales se consideran estadísticamente iguales. El tratamiento testigo, sin reguladores del crecimiento, se presenta en el grupo con menor respuesta a esta variable.

También puede observarse que los tratamientos agrupados se componen indistintamente de combinaciones CIN-ANA y BAP-ANA. Los cuatro mayores porcentajes de regeneración corresponden a los tratamientos con los niveles de citocinina más bajos, es decir, CIN 3.0 y BAP 0.2 mg/l, indistintamente del nivel combinado de auxina (ANA).

CUADRO 4. Respuesta de los reguladores del crecimiento a la regeneración de plantas verdes.

No.	TRATAMIENTOS			% DE REGENERACIÓN PROMEDIO DE PLANTAS VERDES	AGRUPACIÓN BASADA EN LA PRUEBA "t" DE STUDENT					
	CIN	BAP	ANA		A	B	C	D	E	F
11	-	0.2	0.50	46.7	A					
2	3	-	0.50	40.0	A	B	C			
1	3	-	0.25	36.7	A	B	C	D		
12	-	0.2	0.75	33.3	A	B	C	D		
18	-	2	0.75	30.0	A	B	C	D	E	
4	4	-	0.25	26.7	A	B	C	D	E	
9	5	-	0.75	26.7	A	B	C	D	E	F
13	-	1	0.25	20.0		B	C	D	E	F
8	5	-	0.50	16.7			C	D	E	F
15	-	1	0.75	16.7			C	D	E	F
17	-	2	0.50	16.7			C	D	E	F
6	4	-	0.75	13.3				D	E	F
10	-	0.2	0.25	13.3				D	E	F
16	-	2	0.25	13.3				D	E	F
5	4	-	0.50	10.0					E	F
3	3	-	0.75	6.7						F
7	5	-	0.25	6.7						F
14	-	1	0.50	6.7						F
0	0	0	0	6.7						F

Al analizar el porcentaje de regeneración de plantas verdes mostrado por los genotipos evaluados, resultó ser mayor para MPI-116 con 40.0, seguido de COLOM que presentó 16.3 y por último LA- 43 con 4.7 (figura 2).

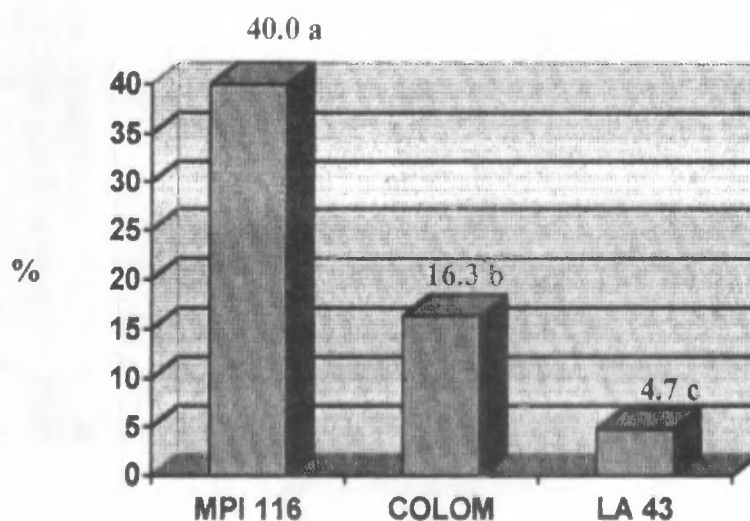


Figura 2. Respuesta de los genotipos evaluados a la regeneración de plantas verdes.

Comparando la respuesta de esta variable, en los tratamientos agrupados por tipo de reguladores utilizados en el medio de cultivo, no se encontró diferencia entre utilizar la combinación CIN-ANA o BAP-ANA, que presentaron 20.4 y 21.9 % respectivamente, de regeneración de plantas verdes, como muestra la figura 3.

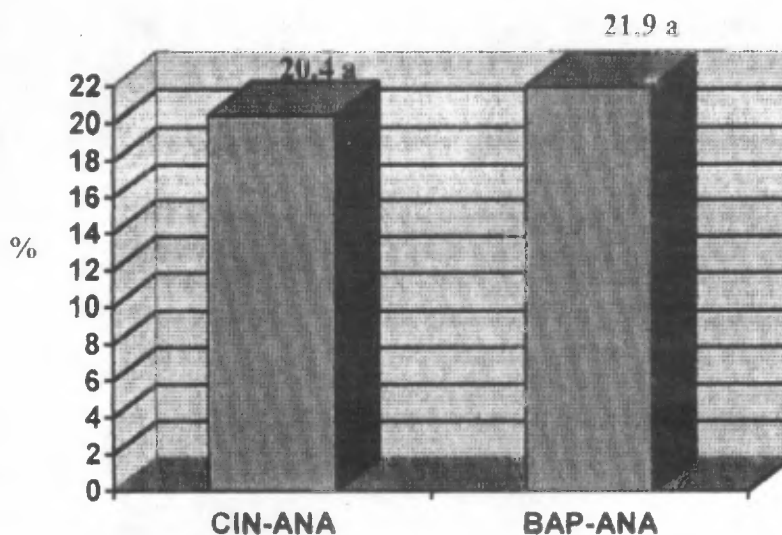


Figura 3. Respuesta a la regeneración de plantas verdes de los tratamientos agrupados por tipo de regulador del crecimiento.

Los resultados anteriores confirman la influencia significativa que tienen los niveles de reguladores del crecimiento utilizados, el medio de cultivo y el genotipo. Es posible que en los niveles de citocininas donde mas plantas verdes se regeneraron haya existido ese equilibrio entre la cinetina y la auxina que se requiere para incrementar el porcentaje de regeneración, ya que, como lo mencionan Bhaskaran y Smith (1), la frecuencia de inducción de callos embriogénicos, la morfología, su relativa velocidad de crecimiento y regeneración de plantas, está influenciada por el genotipo, el medio de cultivo y la interacción genotipo y medio de cultivo.

En la investigación realizada por Chu y Croughan (6), en la que determinaron la influencia genética en la habilidad de regeneración de plantas en cultivo de panículas inmaduras de arroz; el cultivar *japónica* Lemont, presentó una alta habilidad en la regeneración de plantas. En contraste con el cultivar *indica* IR36 el cual presentó una baja regeneración de las mismas.

Al realizar una comparación de los genotipos, con la investigación realizada por Chu y Croughan y la realizada en este trabajo, nos podemos dar cuenta que se obtuvieron resultados contrarios en cuanto a la respuesta de la regeneración de plantas verdes, ya que LA-43 que es una línea mutante del cultivar *japónica* Lemont, presentó una baja regeneración de plantas verdes, mientras que la línea MPI-116 y la variedad ICTA COLOMGUA que son cultivares *indica*, presentaron una mayor regeneración de plantas verdes.

Esta diferencia en la respuesta de los genotipos puede deberse a la fuente utilizada como explante, pues Chu y Croughan utilizaron panículas inmaduras para iniciar la formación de callo, mientras que en el presente estudio se utilizó el embrión de semilla madura ya que, como lo menciona Bhaskaran y Smith (1), aún explantes de un único genotipo no responden idénticamente en el cultivo, debido principalmente a gradientes de hormonas endógenas.

8.4 Variable número de brotes por callo

El número de brotes por callo obtenido en cada una de las 18 combinaciones de reguladores del crecimiento y del testigo se muestran en el cuadro 5. También se presenta la similitud o diferencia entre tratamientos, basado en la agrupación obtenida mediante la prueba de comparación de medias.

Se observa la formación de tres grupos con diferente respuesta. El grupo con mayor número de brotes consta de nueve tratamientos estadísticamente iguales. Dentro de este grupo puede observarse que los cuatro tratamientos, que presentaron los promedios más altos, corresponden a los mismos con mayor porcentaje de regeneración de plantas verdes (tratamientos 11, 2, 1 y 12). El cuadro también muestra que la respuesta del tratamiento testigo (sin reguladores del crecimiento), corresponde al grupo que presentó el menor número de brotes por callo. La distribución de tratamientos agrupados por tipo de citocinina CIN-ANA y BAP-ANA se distribuyen indistintamente dentro de los tres grupos de respuesta encontrados, de igual forma que en la variable anterior.

CUADRO 5. Respuesta del número de brotes por callo según reguladores del crecimiento.

No.	TRATAMIENTO			NUMERO DE BROTES PROMEDIO	AGRUPACIÓN BASADA EN LA PRUEBA "t" DE STUDENT		
	CIN	BAP	ANA				
11	-	0.2	0.50	1.7	A		
12	-	0.2	0.75	1.6	A	B	
2	3	-	0.50	1.5	A	B	
1	3	-	0.25	1.3	A	B	
9	5		0.75	1.0	A	B	C
13	-	1	0.25	1.0	A	B	C
6	4	-	0.75	0.7	A	B	C
17	-	2	0.50	0.7	A	B	C
18	-	2	0.75	0.7	A	B	C
4	4	-	0.25	0.6		B	C
10	-	0.2	0.25	0.6		B	C
8	5	-	0.50	0.5		B	C
15	-	1	0.75	0.4			C
14	-	1	0.50	0.4			C
5	4	-	0.50	0.4			C
18	-	2	0.25	0.3			C
7	5	-	0.25	0.2			C
3	3	-	0.75	0.1			C
0	0	0	0	0.1			C

El número de brotes por callo resultó diferente para los genotipos evaluados, siendo MPI-116 el que presentó la mayor respuesta con 1.4 brotes, seguido de COLOMGUA que tuvo 0.6 brotes y por último LA-43 con 0.2 brotes (figura 4).

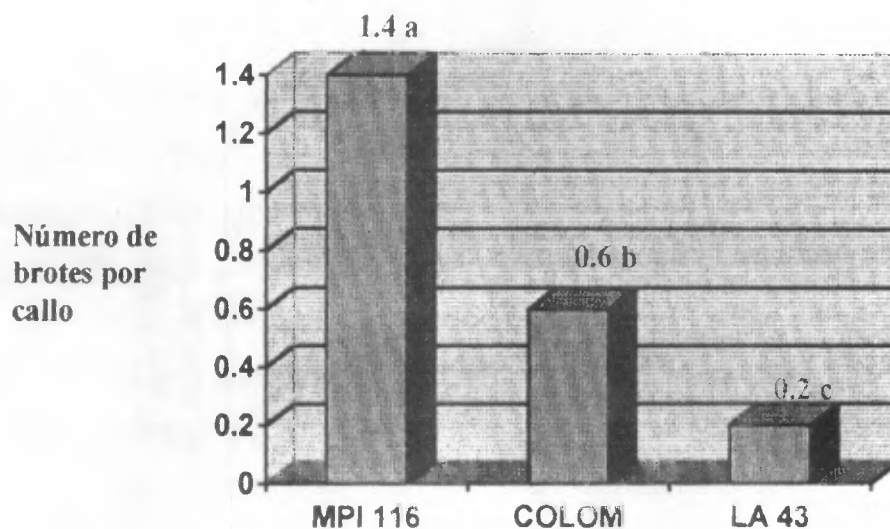


Figura 4. Respuesta al número de brotes por callo de los tres genotipos evaluados

Al analizar los resultados de esta variable respuesta, agrupando los tratamientos con base en el tipo de citocinina, no se encontró diferencia entre utilizar la combinación CIN-ANA o BAP-ANA, mostrando un promedio de 0.7 y 0.8 brotes por callo, respectivamente (figura 5).

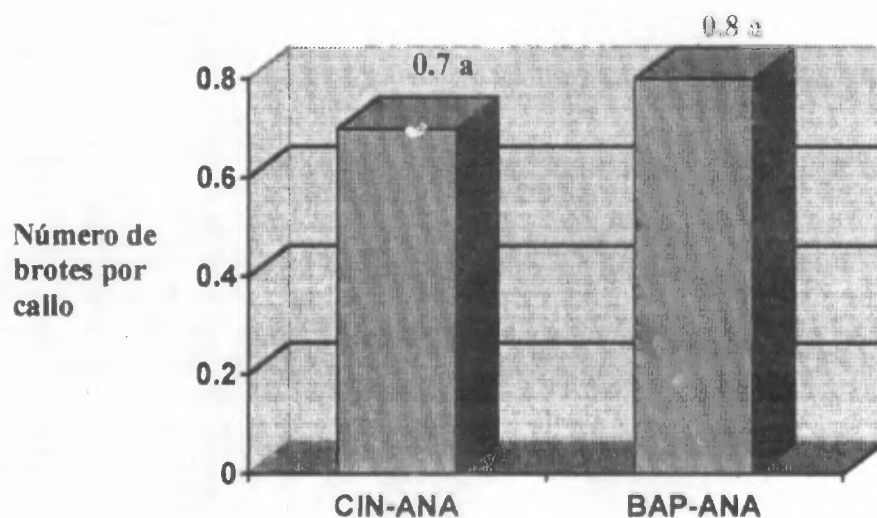


Figura 5. Respuesta al número de brotes por callo, de los tratamientos agrupados por tipo de combinaciones de reguladores del crecimiento.

Los resultados correspondientes a la variable número de brotes por callo confirman, al igual que en la variable anterior, el efecto significativo que tienen los niveles de reguladores del crecimiento y el genotipo sobre la respuesta al cultivo *in vitro*. Los reguladores del crecimiento pueden incrementarse o disminuirse dentro del medio de cultivo para llegar a obtener un mayor número de plantas verdes, pero el genotipo, por sus características genéticas, está predeterminado a desarrollar un mayor número de plantas ya que se producen en los callos células que desarrollan puntos verdes de los cuales van a brotar plantas. Es posible que esta característica genética del genotipo unido a los niveles de reguladores del crecimiento sea la que predetermine el número de brotes que se van a regenerar, ya que, como lo dice Bhaskaran y Smith (1), ya que se han presentado evidencias que en el cultivo de arroz la habilidad de regeneración está controlada por genes del núcleo y del citoplasma. Mroginski y Roca (14) mencionan que al manipular los niveles exógenos de cinetina y auxina se puede fomentar el desarrollo de brotes o de raíces en los cultivos de callo y George (10) dice que la formación de brotes adventicios, sea directamente del tejido del explante o indirectamente del callo, es regulado por una interacción entre auxinas y citocininas.

8.5 Variable altura de brotes

La altura de brotes de los tratamientos con diferentes niveles de reguladores del crecimiento y el testigo se presentó en un rango de 1.9–7.9 cm (cuadro 6), sin embargo, la prueba de comparación de medias determinó que son iguales estadísticamente. Estos resultados nos indican que los niveles de reguladores dentro del medio de cultivo, evaluados en este trabajo, no ejercen influencia sobre la altura de los brotes regenerados.

CUADRO 6. Respuesta de la altura de brotes a los reguladores del crecimiento.

No.	TRATAMIENTO			ALTURA DE BROTES PROMEDIO	AGRUPACIÓN BASADA EN LA PRUEBA "t" DE STUDENT
	CIN	BAP	ANA		
5	4	-	0.50	7.9	A
0	0	0	0	7.6	A
4	4	-	0.25	7.2	A
7	5	-	0.25	6.1	A
6	4	-	0.75	5.8	A
13	-	1	0.25	5.5	A
11	-	0.2	0.50	5.4	A
2	3	-	0.50	5.2	A
15	1	-	0.75	5.0	A
1	3	-	0.25	4.6	A
12	-	0.2	0.75	3.2	A
10	-	0.2	0.25	3.0	A
9	5	-	0.75	2.7	A
14	-	1	0.50	2.7	A
8	5	-	0.50	2.6	A
16	-	2	0.25	2.4	A
18	-	2	0.75	2.3	A
17	-	2	0.50	2.3	A
3	3	-	0.75	1.9	A

De igual forma, al hacer el análisis de altura de brotes en los tres genotipos evaluados, la prueba de medias determinó que no existe diferencia entre ellos, siendo 4.0, 5.1 y 3.3 cm la altura de brotes presentada por los genotipos MPI-116, COLOMGUA y LA-43, respectivamente (figura 6). Esto indica que el genotipo no es un factor que ejerza influencia sobre la altura de los brotes regenerados.

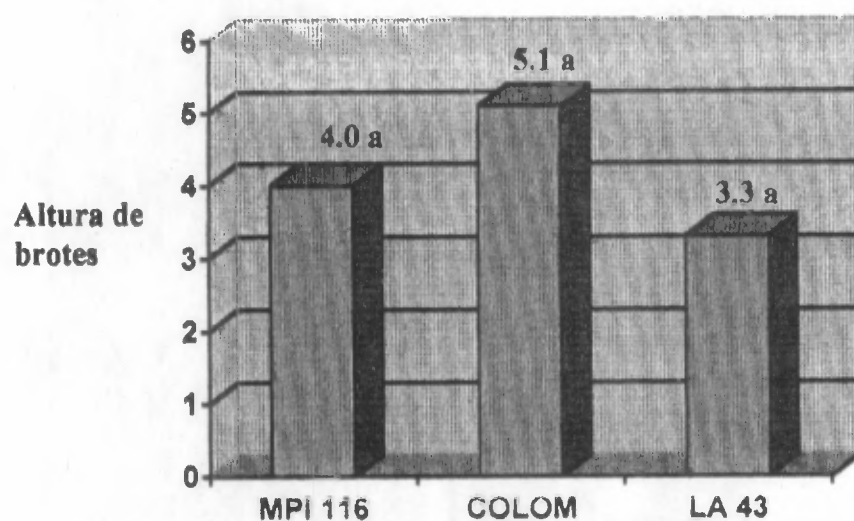


Figura 6. Respuesta a la altura de brotes de los tres genotipos evaluados.

Al realizar el análisis de la variable altura de brotes agrupando los tratamientos por tipo de citocinina, no se encontró diferencia entre utilizar la combinación CIN-ANA o BAP-ANA, siendo 4.9 y 3.5 cm la altura promedio de brotes, respectivamente (figura 7).

Es posible que esta no significancia en la variable altura de brote se deba al efecto que tiene la intensidad lumínica, la temperatura y el número de brote dentro de la unidad experimental, ya que entre más brotes se tenga dentro de la unidad experimental, mayor será el espacio físico a ocupar y menor será la cantidad de nutrientes disponibles; es decir se va a dar una competencia por luz, nutrientes y espacio dentro de la unidad experimental, lo que va a repercutir en el crecimiento del brote y no va a depender tanto del genotipo y la calidad de nutrientes dentro del medio de cultivo.

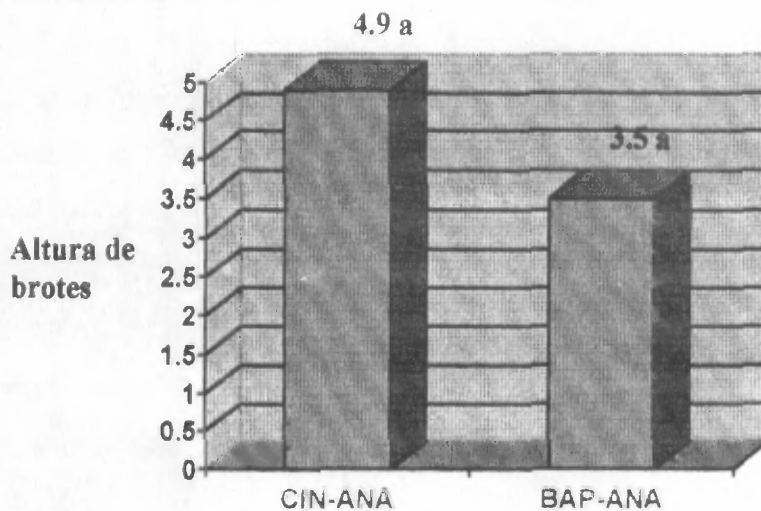


Figura 7. Respuesta a la altura de brotes, de los tratamientos agrupados por tipo de regulador del crecimiento.

8.6 Análisis tipo superficie de respuesta

Este análisis es de utilidad para futuros experimentos o cuando se desea optimizar la respuesta de las variables analizadas.

Con los datos obtenidos en esta investigación para cada genotipo y cada combinación de reguladores del crecimiento, se pueden seguir realizando futuras investigaciones que se enmarquen dentro de estos rangos ya establecidos, para determinar en una mejor forma, cuales son los niveles más adecuados de CIN-ANA y BAP-ANA para cada uno de los

genotipos analizados y obtener así una mejor cantidad de plantas verdes, que es lo que se desea cuando se está trabajando a nivel de cultivo *in vitro*.

8.6.1 Genotipo MPI-116

Como se puede observar en la figura 8, cuando se utilizó CIN-ANA en el medio de cultivo, el modelo de regresión predice que utilizando cantidades de 3.3 mg/l de CIN con 0.4 mg/l de ANA, se puede obtener como mínimo un 55% de plantas verdes, entre 1.6-1.8 brotes y entre 2.62-3.0 cm de altura para cada brote. Cuando se utilizó BAP-ANA (figura 9), se observa que con cantidades menores de 0.3 mg/l de BAP y cantidades mayores de 0.7 mg/l de ANA se puede obtener como mínimo 60% de plantas verdes 2.08 brotes y entre 2.4-2.6 cm de altura para cada brote.

8.6.2 Genotipo COLOMGUA

En la figura 10, cuando se utilizó CIN-ANA en el medio de cultivo, predice que utilizando cantidades menores de 3.9 mg/l de CIN y cantidades menores de 0.25 mg/l de ANA, se puede obtener como mínimo un 45% de plantas verdes, entre 1.4-1.6 brotes y 2.67 cm como mínimo de altura para cada brote. Cuando se utilizó BAP-ANA (figura 11), se observa que con cantidades menores de 0.3 mg/l de BAP y cantidades que van entre 0.50-0.75 mg/l de ANA se puede obtener como mínimo 24% de plantas verdes, entre 0.98-1.11 brotes y entre 0.75-1.20 cm de altura para cada brote.

8.6.3 Genotipo LA-43

En la figura 12, se puede observar que cuando se utilizó CIN-ANA en el medio de cultivo, con cantidades menores de 3.3 mg/l de CIN y entre 0.40-0.65 mg/l de ANA, se puede obtener, como mínimo, un 9% de plantas verdes, entre 0.12-0.15 brotes y entre 0.5-0.6 cm de altura para cada brote. Cuando se utilizó BAP-ANA (figura 13), se observa que con cantidades menores de 0.2 mg/l de BAP y cantidades que van entre 0.45-0.65 mg/l de ANA se puede obtener como mínimo 26% de plantas verdes, entre 0.75-0.88 brotes y entre 1.2-1.4 cm de altura para cada brote.

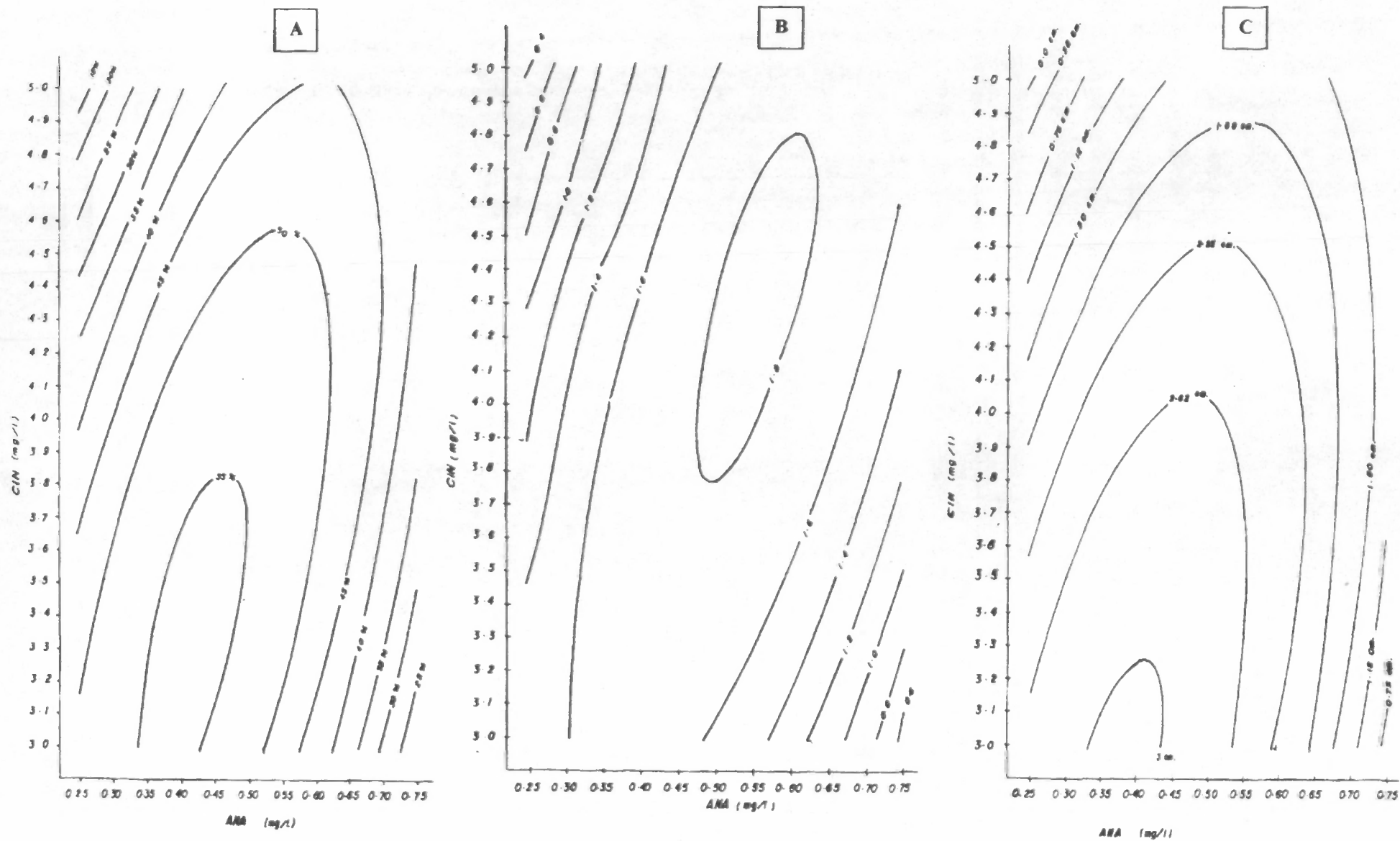


FIGURA 8. Superficie de respuesta para el genotipo MPI-116. A, Porcentaje de regeneración de plantas verdes. B, Número de brotes por callo. C, Altura de brotes. CIN - ANA.

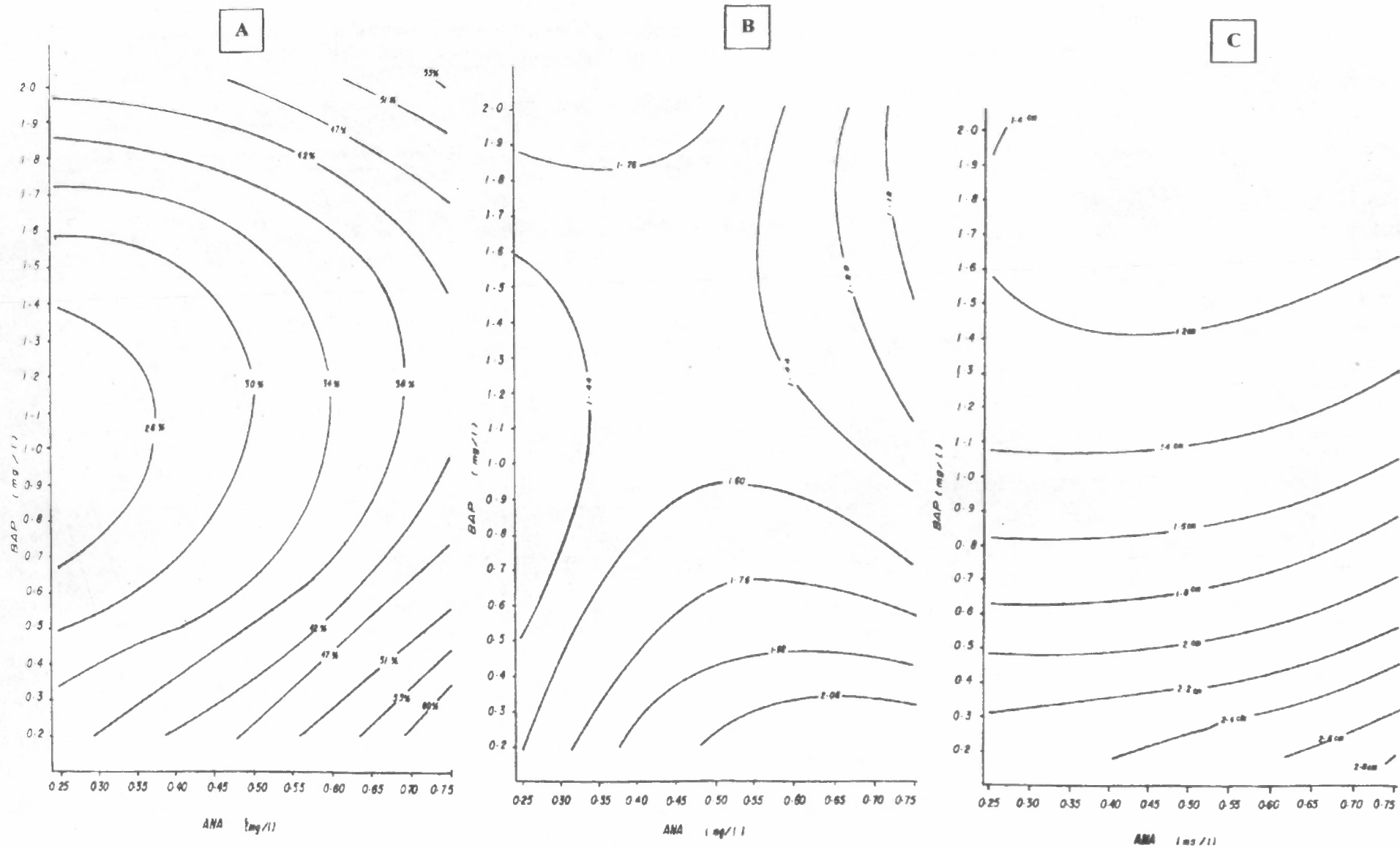


FIGURA 9. Superficie de respuesta para el genotipo MPI-116. A, Porcentaje de regeneración de plantas verdes. B, Número de brotes por callo. C, Altura de brotes. BAP - ANA.

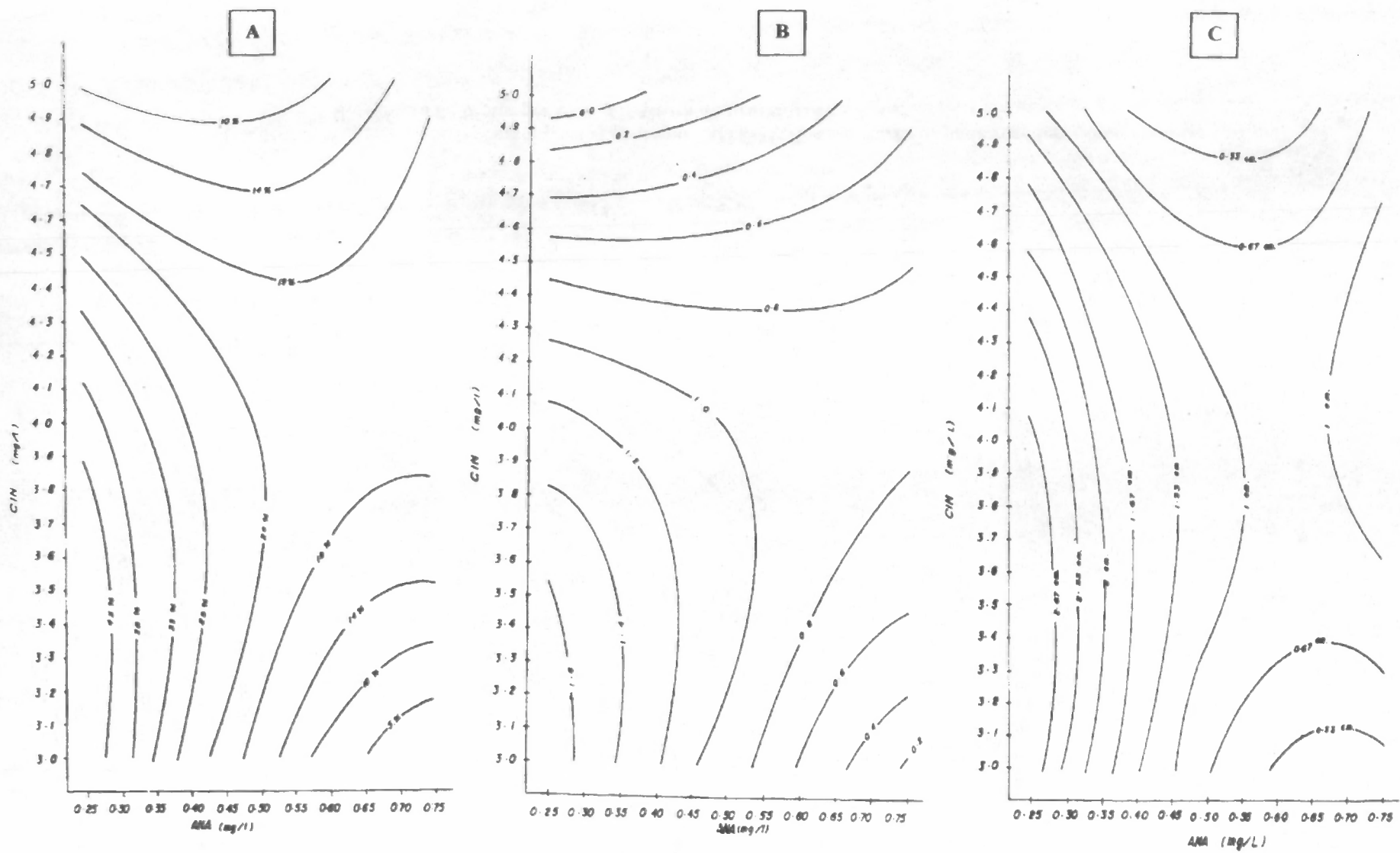


FIGURA 10. Superficie de respuesta para el genotipo COLOMGUA. A, Porcentaje de regeneración de plantas verdes. B, Número de brotes por callo. C, Altura de brotes. CIN - ANA.

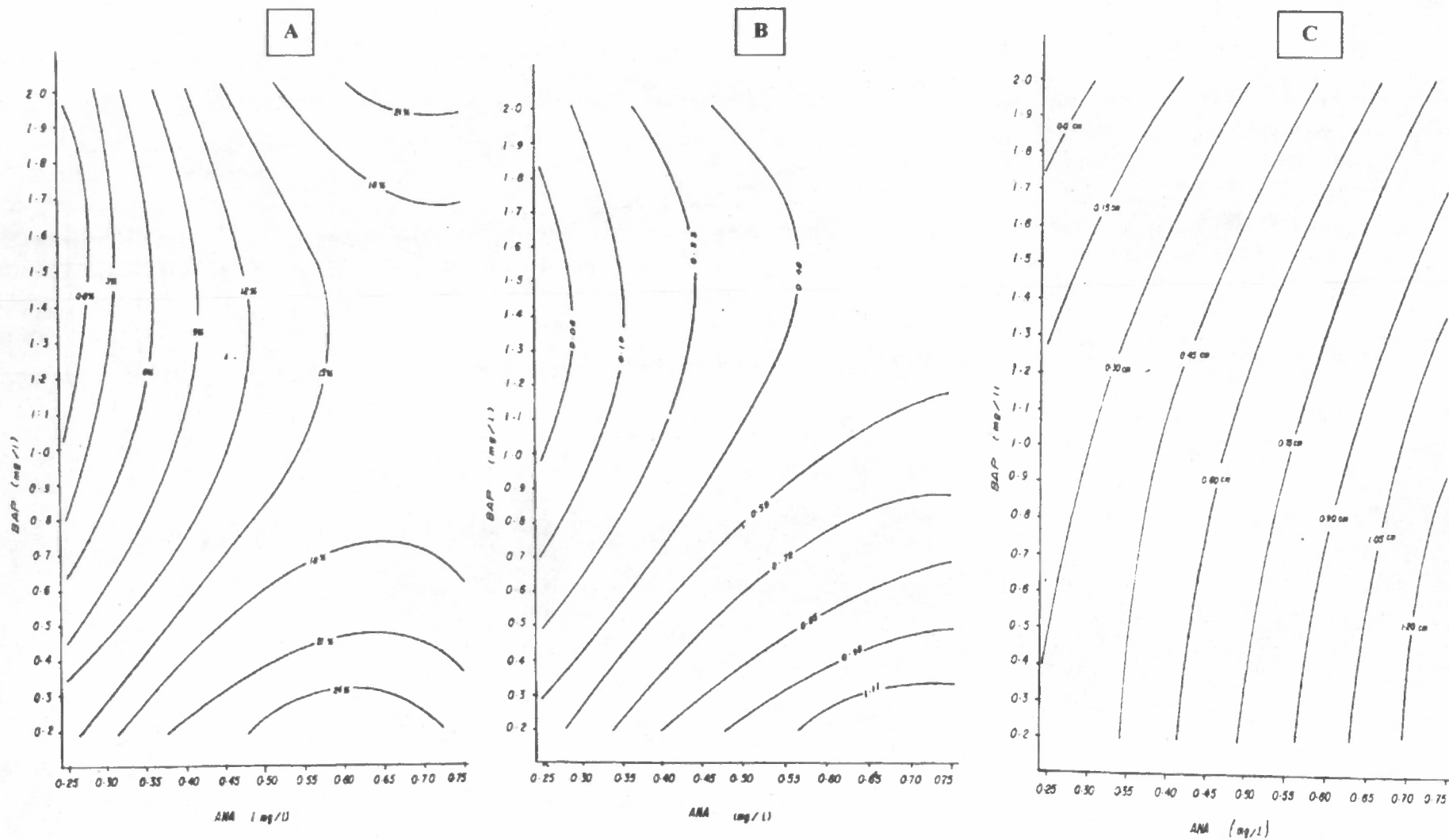


FIGURA 11. Superficie de respuesta para el genotipo COLOMGUA. A, Porcentaje de regeneración de plantas verdes. B, Número de brotes por callo. C, Altura de brotes. BAP - ANA.

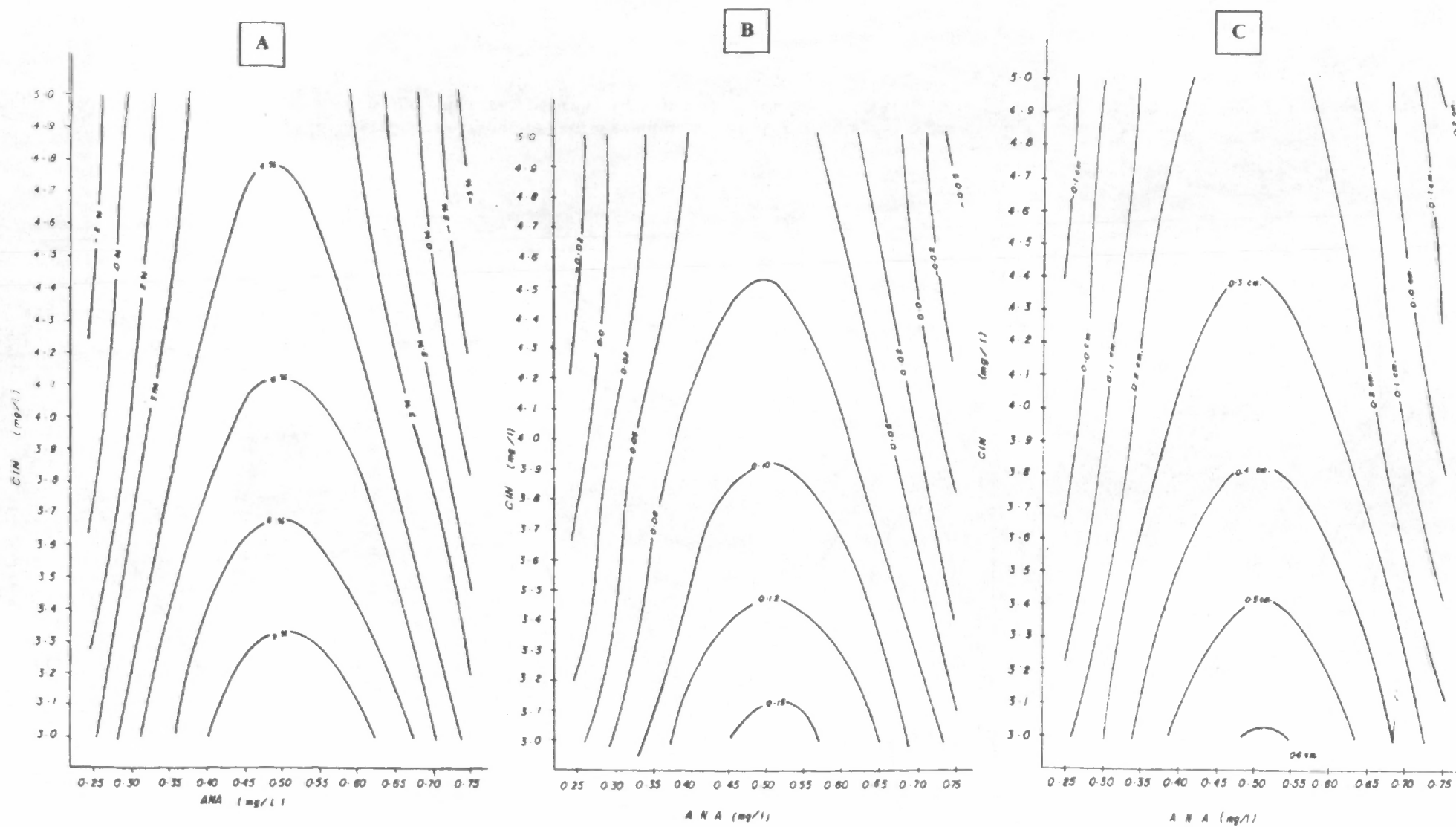


FIGURA 12. Superficie de respuesta para el genotipo LA-43. A, Porcentaje de regeneración de plantas verdes. B, Número de brotes por callo. C, Altura de brotes. CIN - ANA.

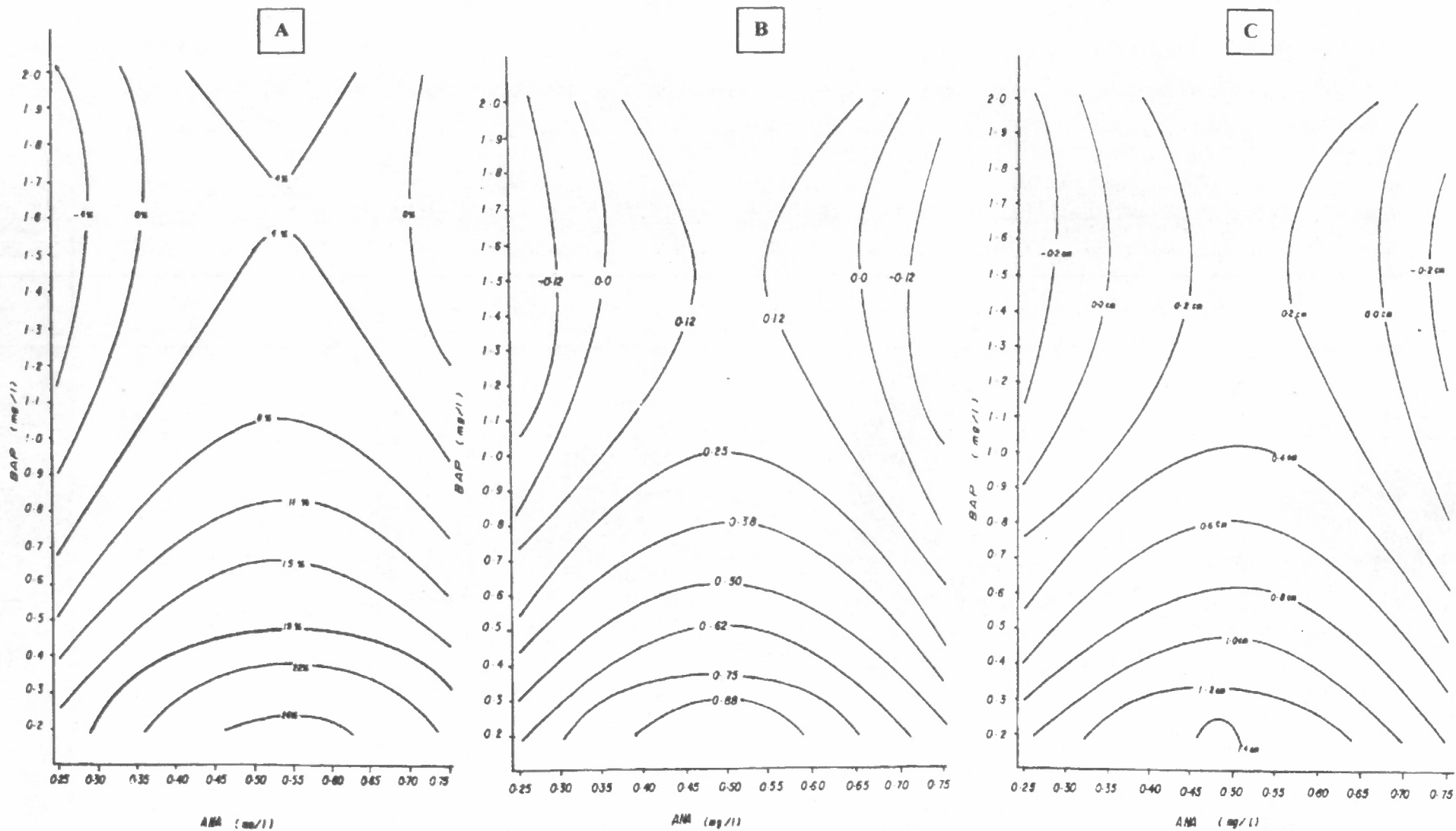


FIGURA 13. Superficie de respuesta para el genotipo LA-43. A, Porcentaje de regeneración de plantas verdes. B, Número de brotes por callo. C, Altura de brotes. BAP - ANA.

9. CONCLUSIONES

9.1 La mejor regeneración de plantas resultó ser el cultivo de callos en medio MS suplementado con 0.2 mg/l de BAP mas 0.50 mg/l de ANA ó 3 mg/l de CIN mas 0.50 mg/l de ANA.

9.2 El genotipo MPI-116 fue el que regeneró la mayor cantidad de planta verdes, seguido del genotipo COLOMGUA y en forma deficiente el genotipo LA-43.

9.3 No se encontró diferencias entre las combinaciones CIN-ANA y BAP-ANA para la regeneración de plantas verdes, es decir, que es indiferente utilizar cualquiera de las dos combinaciones de reguladores.

9.4 La altura de brotes no fue influenciada por ninguno de los tratamientos evaluados.

10. RECOMENDACIONES

- 10.1 Se recomienda utilizar las combinaciones de reguladores del crecimiento 0.2 mg/l de BAP con 0.50 mg/l de ANA y 3 mg/l de CIN con 0.50 mg/l de ANA, ya que son las que en promedio presentaron los más altos porcentajes de regeneración de plantas verdes.
- 10.2 Para regenerar grandes cantidades de plantas por medio de esta técnica, se recomienda utilizar el genotipo MPI-116 por ser el que presenta mayor porcentaje de regeneración de plantas y mayor número de brotes por callo.
- 10.3 Para la regeneración de plantas de arroz a partir de tejido no diferenciado, se pueden utilizar cualquiera de las combinaciones de reguladores del crecimiento CIN-ANA o BAP-ANA.
- 10.4 Se recomienda seguir explorando niveles de CIN-ANA y BAP-ANA, para poder incrementar el porcentaje de regeneración de plantas verdes; estos niveles son: 3.3 mg/l de CIN con 0.4 mg/l de ANA y 0.3 mg/l de BAP con cantidades mayores de 0.7 mg/l de ANA, para el genotipo MPI-116; para el genotipo COLOMGUA niveles de 3.9 mg/l de CIN con cantidades menores de 0.25 mg/l de ANA y cantidades menores de 0.3 mg/l de BAP con cantidades entre 0.50-0.75 mg/l de ANA; mientras que para el genotipo LA-43, niveles de 3.3 mg/l de CIN y entre 0.40-0.65 mg/l de ANA y cantidades menores de 0.2 mg/l de BAP con cantidades entre 0.45-0.65 mg/l de ANA.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. BHASKARAN, S.; SMITH, R. 1990. Regeneration in cereal tissue culture: a review. *Crop Science*. 30 (6): 1,328-1,330
2. BIDWELL, R.G.S. 1983. Fisiología vegetal. Trad. Guadalupe Jerónimo Cano y Manuel Rojas Garcidueñas. México, A.G.T. Editor. 784 p
3. BREGITZER, P. 1992. Plant regeneration and callus type in barley: effects of genotype and culture medium. *Crop Science*. 32 (4): 1,108-1,112.
4. CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. 1995. Registro de cruzamiento de arroz. Colombia, CIAT. 313 p.
5. COCHRAN, W.; COX, G. 1987. Diseños experimentales. México, Trillas. p 372-415.
6. CHU, Q. R.; CROUGHAN, T. P. 1990. Genetic of plant regeneration in immature panicle culture of rice. *Crop Science*. 30 (6): 1,194 - 1,197.
7. COLL, J. *et al.* 1980. Fisiología vegetal. Madrid, España, Ediciones Pirámide. 750 p.
8. DEVLIN, R.M. 1980. Fisiología vegetal. Trad. Xavier Llimona Pages. 3 ed. España, Omega. 517 p.
9. EFFERSON, N.J. 1987. Biotecnología la nueva revolución verde. *Agricultura de las Américas (EE.UU.)* 3 (36) : 20-25.
10. GEORGE, E. 1993. Plant propagation by tissue culture. 2 ed. England, England Exegetics. pte 2. p 435-445.
11. GUATEMALA. BANCO DE GUATEMALA. 2000. Estadísticas de producción, exportación, importación y precios medios de los principales productos agrícolas. Guatemala. 38 p.

12. GUATEMALA. INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLAS. 1984. Arroz, aspectos generales de la producción. Guatemala. 15 p.
13. HURTADO, M.D.; MERINO, M.E. 1988. Cultivo de tejidos vegetales. México, D.F. , Trillas. 232 p.
14. MROGINSKI, L.; ROCA, W. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia, CIAT. 969 p.
15. OROZCO, C. 1996. Cultivo de tejidos y su aplicación en agricultura. *In* Simposio Nacional sobre Cultivo de Tejidos Vegetales (1996, Guatemala). Guatemala, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas. p.6-7.
16. PARSONS, D. B. 1984. Manuales para educación agropecuaria, arroz. México, D.F. , Trillas. 62 p.
17. PAZOS, R. 1999. Arroz ICTA COLOMGUA: nueva variedad de arroz con grano de excelente calidad industrial. Guatemala, ICTA. 1 p.
18. REYES, P. 1980. Diseños experimentales aplicados. México, Trillas. p 104-109.
19. SCHILDE, L. ; SCHIMIEDICHE, P. 1984. El cultivo de tejidos, su pasado, presente y futuro. CIP Circular (Perú). 12 (1): 7.
20. SHEN, H. *et al.* 1994. Toward enhanced and sustainable agricultural productivity in the 2,000's: breeding research and biotechnology. Taiwan, Taichung District Agricultural Improvement Station. v. 2, p 15-23.
21. SOTOMAYOR, J. 1980. Determinación del período de interferencia maleza-arroz (*Oryza sativa* L.) en el parcelamiento Caballo Blanco, Retalhuleu. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 36 p.
22. THORPE, T. A. 1981. Plant Tissue culture; methods and aplicaciones in agriculture. EE.UU., Academic Press. 379 p.

23. -----, 1987. Plant tissue culture and applications in agriculture. New York, Academic Press. 177 p.
24. VASQUEZ NARVAEZ, J. 1983. Cultivo de tejidos en arroz (Oryza sativa L.) inducción de callo y regeneración de plantas. Arroz (Col.) 32:26-30.
25. VILLALOBOS, V.M. 1986. Fundamentos teóricos y prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Chapingo, México, Colegio de Posgraduados, Centro de Genética, Laboratorio de Biotecnología. 192 p.
26. -----, 1998. Fundamentos teóricos y prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Turrialba, C.R., CATIE. 211 p.
27. WEAVER, R. J. 1985. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. Trad. Agustín Contín. México, Trillas. 622 p.



ANEXOS

Cuadro 7A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable regeneración de plantas verdes del genotipo MPI-116. CINETINA - ANA.

REGRESIÓN	G. L.	S. C.	R ²	Fc	P > Fc
Lineal	2	0.254167	0.0110	0.574	0.5652
Cuadrática	2	1.013127	0.0440	2.288	0.1070
Productos Cruzados	1	0.965379	0.0419	4.361	0.0395 *
Total de Regresión	5	2.232673	0.0969	2.017	0.0832

RESIDUAL	G. L.	S. C.	CM	Fc	P > Fc
Falta de Ajuste	4	2.807327	0.701832	3.509	0.0104 *
Error Puro	90	18.000000	0.200000		
Error Total	94	20.807327	0.221355		

PARÁMETRO	G. L.	PARÁMETRO ESTIMADO (PE)	ERROR ESTANDAR	T. PARA HO: PE = 0	PROB > T
INTERCEPTO	1	0.126780	0.148261	0.855	0.3947
CINETINA	1	0.234159	0.249977	0.937	0.3513
ANA	1	0.206811	1.937508	0.107	0.9152
CIN * CIN	1	-0.071981	0.044772	-1.608	0.1112
ANA * CIN	1	0.585759	0.280488	2.088	0.0395 *
ANA * ANA	1	-2.580805	1.650360	-1.564	0.1212

$\bar{x} = 0.360000$

$R^2 = 0.0969$

CV = 130.69

* (p < 0.05)

** (p < 0.01)

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_1^2 + B_4 X_1 X_2 + B_5 X_2^2$$

Cuadro 8A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable regeneración de plantas verdes del genotipo COLOMGUA. CINETINA - ANA.

REGRESIÓN	G. L.	S. C.	R ²	Fc	P > Fc
Lineal	2	0.226667	0.0154	0.852	0.4300
Cuadrática	2	1.121603	0.0760	4.214	0.0177*
Productos Cruzados	1	0.902159	0.0611	6.779	0.0107*
Total de Regresión	5	2.250428	0.1525	3.382	0.0075**

RESIDUAL	G. L.	S. C.	CM	Fc	P > Fc
Falta de Ajuste	4	0.509572	0.127393	0.955	0.4360*
Error Puro	90	12.000000	0.133333		
Error Total	94	12.509572	0.133081		

PARÁMETRO	G. L.	PARÁMETRO ESTIMADO (PE)	ERROR ESTANDAR	T. PARA HO: PE = 0	PROB > T
INTERCEPTO	1	0.016718	0.114958	0.145	0.8847
CINETINA	1	0.686739	0.193827	3.543	0.0006**
ANA	1	-3.796904	1.502299	-2.527	0.0132*
CIN * CIN	1	-0.128173	0.034715	-3.692	0.0004**
ANA * CIN	1	0.566254	0.217484	2.604	0.0107*
ANA * ANA	1	1.154180	1.279652	0.902	0.3694

$\bar{x} = 0.180000$

$R^2 = 0.1525$

CV = 202.67 %

* (p < 0.05)

** (p < 0.01)

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_1^2 + B_4 X_1 X_2 + B_5 X_2^2$$

Cuadro 9A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable regeneración de plantas verdes del genotipo LA-43. CINETINA - ANA.

REGRESIÓN	G. L.	S. C.	R ²	Fc	P > Fc
Lineal	2	0.016667	0.0085	0.437	0.6471
Cuadrática	2	0.150070	0.0766	3.937	0.0228*
Productos Cruzados	1	0.001726	0.0009	0.0906	0.7641
Total de Regresión	5	0.168462	0.0860	1.768	0.1270

RESIDUAL	G. L.	S. C.	CM	Fc	P > Fc
Falta de Ajuste	4	0.191538	0.047884	2.693	0.0358*
Error Puro	90	1.600000	0.017778		
Error Total	94	1.791538	0.019059		

PARÁMETRO	G. L.	PARÁMETRO ESTIMADO (PE)	ERROR ESTANDAR	T. PARA HO: PE = 0	PROB > T
INTERCEPTO	1	0.003096	0.043504	0.0712	0.9434
CINETINA	1	-0.095666	0.073351	-1.304	0.1953
ANA	1	1.252425	0.568523	2.203	0.0300*
CIN * CIN	1	0.009598	0.013137	0.731	0.4669
ANA * CIN	1	-0.024768	0.082304	-0.301	0.7641
ANA * ANA	1	-1.149226	0.484266	-2.373	0.0197*

$\bar{x} = 0.020000$
 $R^2 = 0.0860$
 $CV = 890.27\%$

* (p < 0.05)
 ** (p < 0.01)

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_1^2 + B_4 X_1 X_2 + B_5 X_2^2$$

Cuadro 10A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable número de brotes por callo del genotipo MPI-116. CINETINA - ANA.

REGRESIÓN	G. L.	S. C.	R ²	Fc	P > Fc
Lineal	2	9.493333	0.0195	0.979	0.3793
Cuadrática	2	7.591986	0.0156	0.783	0.4599
Productos Cruzados	1	14.097178	0.0290	2.909	0.0914
Total de Regresión	5	31.182497	0.0641	1.287	0.2762

RESIDUAL	G. L.	S. C.	CM	Fc	P > Fc
Falta de Ajuste	4	42.377503	10.594378	2.308	0.0641
Error Puro	90	413.200000	4.591111		
Error Total	94	455.577503	4.846569		

PARÁMETRO	G. L.	PARÁMETRO ESTIMADO (PE)	ERROR ESTANDAR	T. PARA HO: PE = 0	PROB > T
INTERCEPTO	1	0.195201	0.693744	0.281	0.7790
CINETINA	1	0.716615	1.169698	0.613	0.5416
ANA	1	0.378741	9.066014	0.0418	0.9668
CIN * CIN	1	-0.229876	0.209498	-1.097	0.2753
ANA * CIN	1	2.238390	1.312462	1.705	0.0914
ANA * ANA	1	-8.938700	7.722390	-1.158	0.2500

$\bar{x} = 0.180000$
 $R^2 = 0.0641$
 $CV = 186.57\%$

* (p < 0.05)
 ** (p < 0.01)

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_1^2 + B_4 X_1 X_2 + B_5 X_2^2$$

Cuadro 11A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable número de brotes por callo del genotipo COLOMUA. CINETINA - ANA.

REGRESIÓN	G. L.	S. C.	R ²	Fc	P > Fc
Lineal	2	0.016667	0.0001	0.00339	0.9966
Cuadrática	2	18.132509	0.0689	3.692	0.0286*
Productos Cruzados	1	14.089380	0.0536	5.738	0.0189*
Total de Regresión	5	32.238555	0.1226	2.626	0.0287*

RESIDUAL	G. L.	S. C.	CM	Fc	P > Fc
Falta de Ajuste	4	20.201445	5.050361	2.158	0.0801
Error Puro	90	210.600000	2.340000		
Error Total	94	230.801445	2.455335		

PARÁMETRO	G. L.	PARÁMETRO ESTIMADO (PE)	ERROR ESTANDAR	T. PARA HO: PE = 0	PROB > T
INTERCEPTO	1	0.070279	0.493784	0.142	0.8871
CINETINA	1	2.271723	0.832553	2.729	0.0076**
ANA	1	-10.583282	6.452894	-1.640	0.1043
CIN * CIN	1	-0.472136	0.149114	-3.166	0.0021**
ANA * CIN	1	2.237771	0.934168	2.395	0.0186*
ANA * ANA	1	0.792570	5.496546	0.144	0.8857

$$\bar{x} = 0.640000$$

$$R^2 = 0.1226$$

$$CV = 244.84 \%$$

* (p < 0.05)

** (p < 0.01)

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_1^2 + B_4 X_1 X_2 + B_5 X_2^2$$

Cuadro 12A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable número de brotes por callo del genotipo LA-43. CINETINA - ANA

REGRESIÓN	G. L.	S. C.	R ²	Fc	P > Fc
Lineal	2	0.037500	0.0076	0.389	0.6788
Cuadrática	2	0.337657	0.0688	3.503	0.0341*
Productos Cruzados	1	0.003883	0.0008	0.0806	0.7772
Total de Regresión	5	0.379040	0.0772	1.573	0.1753

RESIDUAL	G. L.	S. C.	CM	Fc	P > Fc
Falta de Ajuste	4	0.430960	0.107740	2.365	0.0588
Error Puro	90	4.100000	0.045556		
Error Total	94	4.530960	0.044202		

PARÁMETRO	G. L.	PARÁMETRO ESTIMADO (PE)	ERROR ESTANDAR	T. PARA HO: PE = 0	PROB > T
INTERCEPTO	1	0.004644	0.069185	0.0671	0.9466
CINETINA	1	-0.143498	0.116651	-1.230	0.2217
ANA	1	1.878638	0.904129	2.078	0.0405*
CIN * CIN	1	0.014396	0.020893	0.689	0.4925
ANA * CIN	1	-0.037152	0.130888	-0.284	0.7772
ANA * ANA	1	-1.723839	0.770133	-2.238	0.0276*

$$\bar{x} = 0.030000$$

$$R^2 = 0.0772$$

$$CV = 731.83 \%$$

* (p < 0.05)

** (p < 0.01)

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_1^2 + B_4 X_1 X_2 + B_5 X_2^2$$

Cuadro 13A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable longitud de brotes del genotipo MPI-116. CINETINA - ANA.

REGRESIÓN	G. L.	S. C.	R ²	Fc	P>Fc
Lineal	2	0.215267	0.0003	0.0155	0.9847
Cuadrática	2	57.721506	0.0779	4.145	0.0188*
Productos Cruzados	1	28.762668	0.0388	4.131	0.0449*
Total de Regresión	5	86.699441	0.1170	2.491	0.0365*

RESIDUAL	G. L.	S. C.	CM	Fc	P>Fc
Falta de Ajuste	4	63.467059	15.866765	2.146	0.0544
Error Puro	90	590.961000	6.566233		
Error Total	94	654.428059	6.962001		

PARÁMETRO	G. L.	PARÁMETRO ESTIMADO (PE)	ERROR ESTANDAR	T. PARA HO: PE = 0	PROB > T
INTERCEPTO	1	0.634087	0.831475	0.763	
CINETINA	1	1.149724	1.401921	0.820	0.4476
ANA	1	4.411868	10.865913	0.406	0.6856
CIN * CIN	1	- 0.416331	0.251090	-1.658	0.1006
ANA * CIN	1	3.197307	1.573029	2.033	0.0449*
ANA * ANA	1	-18.108978	9.255536	-1.957	0.0534

$$\bar{x} = 1.515000$$

$$R^2 = 0.1170$$

$$CV = 174.16 \%$$

* (p < 0.05)

** (p < 0.01)

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_1^2 + B_4 X_1 X_2 + B_5 X_2^2$$

Cuadro 14A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable longitud de brotes del genotipo COLOMGUA. CINETINA - ANA.

REGRESIÓN	G. L.	S. C.	R ²	Fc	P>Fc
Lineal	2	18.151042	0.0177	0.914	0.4044
Cuadrática	2	60.044189	0.0586	3.024	0.0533
Productos Cruzados	1	13.763804	0.0134	1.387	0.2420
Total de Regresión	5	91.959034	0.0897	1.853	0.1101

RESIDUAL	G. L.	S. C.	CM	Fc	P>Fc
Falta de Ajuste	4	9.186966	2.296741	0.224	0.9545
Error Puro	90	923.924000	10.265822		
Error Total	94	933.110966	9.926712		

PARÁMETRO	G. L.	PARÁMETRO ESTIMADO (PE)	ERROR ESTANDAR	T. PARA HO: PE = 0	PROB > T
INTERCEPTO	1	- 0.0439771	0.992853	- 0.0443	0.9648
CINETINA	1	4.452941	1.674014	2.660	0.0092**
ANA	1	-25.364902	12.974837	- 1.955	0.0536
CIN * CIN	1	- 0.734559	0.299823	- 2.450	0.0161*
ANA * CIN	1	2.211765	1.878332	1.178	0.2420
ANA * ANA	1	13.465882	11.051908	1.218	0.9648

$$\bar{x} = 1.070000$$

$$R^2 = 0.0897$$

$$CV = 294.46 \%$$

* (p < 0.05)

** (p < 0.01)

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_1^2 + B_4 X_1 X_2 + B_5 X_2^2$$

Cuadro 15A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable longitud de brotes del genotipo LA-43. CINETINA- ANA.

REGRESIÓN	G. L.	S. C.	R ²	Fc	P > Fc
Lineal	2	0.560667	0.0074	0.377	0.6871
Cuadrática	2	0.0488344	0.0668	3.392	0.0378*
Productos Cruzados	1	0.058062	0.0008	0.0780	0.7806
Total de Regresión	5	5.667073	0.0749	1.523	0.1900

RESIDUAL	G. L.	S. C.	CM	Fc	P > Fc
Falta de Ajuste	4	6.443327	1.610832	2.283	0.0665
Error Puro	90	63.504000	0.705600		
Error Total	94	69.947327	0.744121		

PARÁMETRO	G. L.	PARÁMETRO ESTIMADO (PE)	ERROR ESTANDAR	T. PARA HO: PE = 0	PROB > T
INTERCEPTO	1	0.017957	0.271834	0.0661	0.9475
CINETINA	1	-0.554861	0.458330	-1.211	0.2291
ANA	1	7.264066	3.552391	2.045	0.0437*
CIN * CIN	1	0.055666	0.082089	0.678	0.4994
ANA * CIN	1	-0.143653	0.514270	-0.279	0.7806
ANA * ANA	1	-6.665511	3.025911	-2.203	0.0301*

$$\bar{x} = 0.116000$$

$$R^2 = 0.0749$$

$$CV = 743.84 \%$$

* (p < 0.05)

** (p < 0.01)

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_1^2 + B_4 X_1 X_2 + B_5 X_2^2$$

Cuadro 16A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable regeneración de plantas verdes del genotipo MPI-116. BAP - ANA.

REGRESIÓN	G. L.	S. C.	R ²	Fc	P > Fc
Lineal	2	0.456649	0.0189	0.924	0.4005
Cuadrática	2	0.766238	0.0313	1.221	0.2175
Productos Cruzados	1	0.061050	0.0025	0.247	0.6203
Total de Regresión	5	1.283936	0.0524	1.039	0.3893

RESIDUAL	G. L.	S. C.	CM	Fc	P > Fc
Falta de Ajuste	4	3.528064	0.881516	4.027	0.0047**
Error Puro	90	19.700000	0.218889		
Error Total	94	23.226064	0.247086		

PARÁMETRO	G. L.	PARÁMETRO ESTIMADO (PE)	ERROR ESTANDAR	T. PARA HO: PE = 0	PROB > T
INTERCEPTO	1	0.3859922	0.148548	2.598	0.0109*
BAP	1	-0.415177	0.334606	-1.241	0.2178
ANA	1	0.176214	0.927752	0.190	0.8498
BAP * BAP	1	0.225857	0.136318	1.657	0.1009
ANA * BAP	1	-0.159701	0.321465	-0.497	0.6203
ANA * ANA	1	0.375457	1.133055	0.331	0.7411

$$\bar{x} = 0.430000$$

$$R^2 = 0.524$$

$$CV = 115.60 \%$$

* (p < 0.05)

** (p < 0.01)

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_1^2 + B_4 X_1 X_2 + B_5 X_2^2$$

Cuadro 17A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable regeneración de plantas verdes del genotipo COLOMGUA. BAP - ANA.

REGRESIÓN	G. L.	S. C.	R ²	Fc	P>Fc
Lineal	2	0.660362	0.0584	2.981	0.0555
Cuadrática	2	0.187293	0.0186	0.846	0.4326
Productos Cruzados	1	0.051831	0.0046	0.468	0.4956
Total de Regresión	5	0.899487	0.0795	1.624	0.1611

RESIDUAL	G. L.	S. C.	CM	Fc	P>Fc
Falta de Ajuste	4	0.110513	0.027628	0.241	0.9141
Error Puro	90	10.300000	0.114444		
Error Total	94	10.410513	0.110750		

PARÁMETRO	G. L.	PARÁMETRO ESTIMADO (PE)	ERROR ESTANDAR	T. PARA HO: PE = 0	PROB > T
INTERCEPTO	1	-0.015508	0.099452	-0.156	0.8764
BAP	1	-0.326620	0.224017	-1.458	0.1482
ANA	1	1.075403	0.621127	1.731	0.0867
BAP * BAP	1	0.096499	0.091264	1.057	0.2931
ANA * BAP	1	0.147233	0.215220	0.684	0.4956
ANA * ANA	1	-0.919795	0.758576	-1.213	0.2283

\bar{x} = 0.13000
 R^2 = 0.0795
 CV = 255.99 %

* (p < 0.05)
 ** (p < 0.01)

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_1^2 + B_4 X_1 X_2 + B_5 X_2^2$$

Cuadro 18A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable regeneración de plantas verdes del genotipo LA-43. BAP - ANA.

REGRESIÓN	G. L.	S. C.	R ²	Fc	P>Fc
Lineal	2	0.610272	0.0937	5.291	0.0066**
Cuadrática	2	0.476694	0.0732	4.133	0.0190*
Productos Cruzados	1	0.001804	0.0003	0.0313	0.8600
Total de Regresión	5	1.088770	0.1672	3.776	0.0037**

RESIDUAL	G. L.	S. C.	CM	Fc	P>Fc
Falta de Ajuste	4	1.121230	0.280308	5.867	0.0003**
Error Puro	90	4.300000	0.047778		
Error Total	94	5.0421230	0.057673		

PARÁMETRO	G. L.	PARÁMETRO ESTIMADO (PE)	ERROR ESTANDAR	T. PARA HO: PE = 0	PROB > T
INTERCEPTO	1	-0.033278	0.071787	-0.464	0.6439
BAP	1	-0.359437	0.161657	-2.223	0.0286*
ANA	1	1.364181	0.448222	3.044	0.0030**
BAP * BAP	1	0.115539	0.065859	1.754	0.0826
ANA * BAP	1	-0.027467	0.155308	-0.177	0.8600
ANA * ANA	1	-1.245919	0.547409	-2.276	0.0251*

\bar{x} = 0.070000
 R^2 = 0.1672
 CV = 343.07 %

* (p < 0.05)
 ** (p < 0.01)

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_1^2 + B_4 X_1 X_2 + B_5 X_2^2$$

Cuadro 19A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable número de brotes por callo del genotipo MPI-116. BAP - ANA.

REGRESIÓN	G. L.	S. C.	R ²	Fc	P > Fc
Lineal	2	3.848043	0.0065	0.317	0.7293
Cuadrática	2	9.632083	0.0164	0.793	0.4556
Productos Cruzados	1	4.469483	0.0076	0.736	0.3932
Total de Regresión	5	17.949610	0.0305	0.591	0.7069

RESIDUAL	G. L.	S. C.	CM	Fc	P > Fc
Falta de Ajuste	4	55.810390	13.952598	2.437	0.0527
Error Puro	90	515.200000	5.724444		
Error Total	94	571.010390	6.074579		

PARÁMETRO	G. L.	PARÁMETRO ESTIMADO (PE)	ERROR ESTANDAR	T. PARA HO: PE = 0	PROB > T
INTERCEPTO	1	0.696253	0.736546	0.945	0.3469
BAP	1	-0.482000	1.659080	-0.291	0.7721
ANA	1	5.086776	4.600089	1.106	0.2716
BAP * BAP	1	0.401754	0.675907	0.594	0.5537
ANA * BAP	1	-1.367220	1.593925	-0.858	0.3932
ANA * ANA	1	-3.633404	5.618044	-0.647	0.5194

$$\bar{x} = 1.520000$$

$$R^2 = 0.0305$$

$$CV = 162.15\%$$

* (p < 0.05)

** (p < 0.01)

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_1^2 + B_4 X_1 X_2 + B_5 X_2^2$$

Cuadro 20A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable número de brotes por callo del genotipo COLOMGUA. BAP - ANA.

REGRESIÓN	G. L.	S. C.	R ²	Fc	P > Fc
Lineal	2	12.134565	0.0559	2.826	0.0643
Cuadrática	2	2.847884	0.0131	0.663	0.5175
Productos Cruzados	1	0.215035	0.0010	0.100	0.7523
Total de Regresión	5	15.197484	0.0700	1.416	0.2257

RESIDUAL	G. L.	S. C.	CM	Fc	P > Fc
Falta de Ajuste	4	3.692516	0.923129	0.419	0.7943
Error Puro	90	198.100000	2.201111		
Error Total	94	201.792516	2.146729		

PARÁMETRO	G. L.	PARÁMETRO ESTIMADO (PE)	ERROR ESTANDAR	T. PARA HO: PE = 0	PROB > T
INTERCEPTO	1	-0.066916	0.437855	-0.153	0.8789
BAP	1	-0.988584	0.986275	-1.002	0.3188
ANA	1	3.712892	2.734618	1.358	0.1778
BAP * BAP	1	0.384054	0.401807	0.956	0.3416
ANA * BAP	1	-0.299891	0.947542	-0.316	0.7523
ANA * ANA	1	-2.215563	3.339763	-0.663	0.5087

$$\bar{x} = 0.510000$$

$$R^2 = 0.0700$$

$$CV = 287.29\%$$

* (p < 0.05)

** (p < 0.01)

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_1^2 + B_4 X_1 X_2 + B_5 X_2^2$$

Cuadro 21A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable número de brotes por callo del genotipo LA-43. BAP - ANA.

REGRESIÓN	G. L.	S. C.	R ²	F _c	P > F _c
Lineal	2	4.783696	0.0629	3.578	0.0318*
Cuadrática	2	8.270782	0.1088	6.186	0.0030**
Productos Cruzados	1	0.104306	0.0014	0.156	0.6937
Total de Regresión	5	13.158784	0.1731	3.937	0.0028**

RESIDUAL	G. L.	S. C.	CM	F _c	P > F _c
Falta de Ajuste	4	15.441216	3.860304	7.330	0.000**
Error Puro	90	47.400000	0.526667		
Error Total	94	62.841216	0.668524		

PARÁMETRO	G. L.	PARÁMETRO ESTIMADO (PE)	ERROR ESTANDAR	T. PARA HO: PE = 0	PROB > T
INTERCEPTO	1	-0.123380	0.244343	-0.505	0.6148
BAP	1	-1.510806	0.550386	-2.745	0.0072**
ANA	1	5.522581	1.526042	3.619	0.0005**
BAP * BAP	1	0.486058	0.224227	2.079	0.0404*
ANA * BAP	1	0.108865	0.528772	0.395	0.6937
ANA * ANA	1	-5.776543	1.863740	-3.099	0.0026**

$$\bar{x} = 0.200000$$

$$R^2 = 0.1731$$

$$CV = 408.82 \%$$

* (p < 0.05)

** (p < 0.01)

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_1^2 + B_4 X_1 X_2 + B_5 X_2^2$$

Cuadro 22A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable longitud de brotes del genotipo MPI-116. BAP - ANA.

REGRESIÓN	G. L.	S. C.	R ²	F _c	P > F _c
Lineal	2	35.303161	0.0413	2.035	0.1364
Cuadrática	2	3.327204	0.0039	0.192	0.8258
Productos Cruzados	1	0.996720	0.0012	0.115	0.7354
Total de Regresión	5	39.677084	0.0464	0.914	0.4756

RESIDUAL	G. L.	S. C.	CM	F _c	P > F _c
Falta de Ajuste	4	98.693316	24.673329	3.099	0.0194*
Error Puro	90	716.572000	7.961911		
Error Total	94	815.265316	8.673035		

PARÁMETRO	G. L.	PARÁMETRO ESTIMADO (PE)	ERROR ESTANDAR	T. PARA HO: PE = 0	PROB > T
INTERCEPTO	1	2.605529	0.880091	2.961	
BAP	1	-1.520346	1.982416	-0.767	0.0039**
ANA	1	-0.183175	5.496594	-0.0333	0.9735
BAP * BAP	1	0.484817	0.807634	0.600	0.5498
ANA * BAP	1	-0.645649	1.904563	-0.339	0.7357
ANA * ANA	1	1.292572	6.712938	0.193	0.8477

$$\bar{x} = 1.828000$$

$$R^2 = 0.0464$$

$$CV = 161.2816 \%$$

* (p < 0.05)

** (p < 0.01)

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_1^2 + B_4 X_1 X_2 + B_5 X_2^2$$

Cuadro 23A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable longitud de brotes del genotipo COLOMUA. BAP - ANA.

REGRESIÓN	G. L.	S. C.	R ²	Fc	P>Fc
Lineal	2	21.242104	0.0666	3.359	0.0390*
Cuadrática	2	0.195136	0.0006	0.0309	0.9696
Productos Cruzados	1	0.079120	0.0002	0.0250	0.8746
Total de Regresión	5	21.516359	0.0675	1.361	0.2461

RESIDUAL	G. L.	S. C.	CM	Fc	P>Fc
Falta de Ajuste	4	16.881741	4.220435	1.355	0.2559
Error Puro	90	280.323000	3.114700		
Error Total	94	297.204741	3.161753		

PARÁMETRO	G. L.	PARÁMETRO ESTIMADO (PE)	ERROR ESTANDAR	T. PARA HO: PE = 0	PROB > T
INTERCEPTO	1	-0.060960	0.531381	-0.115	0.9089
BAP	1	0.059379	1.196942	0.0496	0.9605
ANA	1	1.293821	3.318731	0.390	0.6975
BAP * BAP	1	-0.110891	0.487633	-0.227	0.4206
ANA * BAP	1	-0.181908	1.149936	-0.158	0.8746
ANA * ANA	1	0.798935	4.053134	0.197	0.8442

$\bar{x} = 0.533000$
 $R^2 = 0.0675$
 $CV = 333.61\%$

* (p < 0.05)
 ** (p < 0.01)

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_1^2 + B_4 X_1 X_2 + B_5 X_2^2$$

Cuadro 24A. Análisis de varianza de la superficie de respuesta para la variable longitud de brotes del genotipo LA-43. BAP - ANA.

REGRESIÓN	G. L.	S. C.	R ²	Fc	P>Fc
Lineal	2	11.248929	0.0462	2.471	0.0900
Cuadrática	2	17.868769	0.0734	3.926	0.0230*
Productos Cruzados	1	0.286168	0.0012	0.126	0.7237
Total de Regresión	5	29.401866	0.1208	2.584	0.0310*

RESIDUAL	G. L.	S. C.	CM	Fc	P>Fc
Falta de Ajuste	4	37.248234	9.311558	4.743	0.0016**
Error Puro	90	176.685000	1.963167		
Error Total	94	213.931234	2.275864		

PARÁMETRO	G. L.	PARÁMETRO ESTIMADO (PE)	ERROR ESTANDAR	T. PARA HO: PE = 0	PROB > T
INTERCEPTO	1	-0.188771	0.450832	-0.419	0.6764
BAP	1	-2.200951	1.015506	-2.167	0.0327*
ANA	1	8.252071	2.815667	2.931	0.0042**
BAP * BAP	1	0.659920	0.413716	1.595	0.1140
ANA * BAP	1	0.345956	0.975625	0.355	0.7237
ANA * ANA	1	-8.619451	3.438747	-2.507	0.0139*

$\bar{x} = 0.313000$
 $R^2 = 0.1208$
 $CV = 481.98\%$

* (p < 0.05)
 ** (p < 0.01)

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_1^2 + B_4 X_1 X_2 + B_5 X_2^2$$

CUADRO 25A. Datos obtenidos por tratamiento, repeticiones, genotipos y variables de respuesta para CIN-ANA y BAP-ANA.

REP	TRA	GENOT	PV	N B	L B	REP	TRA	GENOT	PV	N B	L B
R1	T0	COLOM	0	0	0	R6	T0	COLOM	0	0	0
R1	T0	MPI116	0	0	0	R6	T0	MPI116	0	0	0
R1	T0	LA43	0	0	0	R6	T0	LA43	0	0	0
R2	T0	COLOM	0	0	0	R7	T0	COLOM	0	0	0
R2	T0	MPI116	0	0	0	R7	T0	MPI116	0	0	0
R2	T0	LA43	0	0	0	R7	T0	LA43	0	0	0
R3	T0	COLOM	0	0	0	R8	T0	COLOM	0	0	0
R3	T0	MPI116	0	0	0	R8	T0	MPI116	0	0	0
R3	T0	LA43	0	0	0	R8	T0	LA43	0	0	0
R4	T0	COLOM	0	0	0	R9	T0	COLOM	0	0	0
R4	T0	MPI116	0	0	0	R9	T0	MPI116	0	0	0
R4	T0	LA43	0	0	0	R9	T0	LA43	0	0	0
R5	T0	COLOM	0	0	0	R10	T0	COLOM	0	0	0
R5	T0	MPI116	1	1	5.2	R10	T0	MPI116	0	0	0
R5	T0	LA43	0	0	0	R10	T0	LA43	0	0	0
R1	T1	COLOM	0	0	0	R6	T1	COLOM	0	0	0
R1	T1	MPI116	1	5	9.5	R6	T1	MPI116	1	1	1.6
R1	T1	LA43	0	0	0	R6	T1	LA43	0	0	0
R2	T1	COLOM	1	2	2.8	R7	T1	COLOM	1	4	2.3
R2	T1	MPI116	0	0	0	R7	T1	MPI116	0	0	0
R2	T1	LA43	0	0	0	R7	T1	LA43	0	0	0
R3	T1	COLOM	1	3	7.8	R8	T1	COLOM	0	0	0
R3	T1	MPI116	1	1	4.5	R8	T1	MPI116	0	0	0
R3	T1	LA43	0	0	0	R8	T1	LA43	0	0	0
R4	T1	COLOM	1	4	2.6	R9	T1	COLOM	1	6	4.6
R4	T1	MPI116	1	2	3.0	R9	T1	MPI116	0	0	0
R4	T1	LA43	0	0	0	R9	T1	LA43	0	0	0
R5	T1	COLOM	0	0	0	R10	T1	COLOM	1	6	4.6
R5	T1	MPI116	0	0	0	R10	T1	MPI116	1	5	6.9
R5	T1	LA43	0	0	0	R10	T1	LA43	0	0	0
R1	T2	COLOM	0	0	0	R6	T2	COLOM	0	0	0
R1	T2	MPI116	1	1	2.1	R6	T2	MPI116	1	4	6.4
R1	T2	LA43	1	1	8.0	R6	T2	LA43	0	0	0
R2	T2	COLOM	0	0	0	R7	T2	COLOM	1	2	1.4
R2	T2	MPI116	1	7	6.6	R7	T2	MPI116	1	1	3.2
R2	T2	LA43	1	2	3.6	R7	T2	LA43	0	0	0
R3	T2	COLOM	0	0	0	R8	T2	COLOM	1	6	7.5
R3	T2	MPI116	1	6	9.8	R8	T2	MPI116	1	5	2.7
R3	T2	LA43	0	0	0	R8	T2	LA43	0	0	0
R4	T2	COLOM	0	0	0	R9	T2	COLOM	0	0	0
R4	T2	MPI116	1	4	7.5	R9	T2	MPI116	0	0	0
R4	T2	LA43	0	0	0	R9	T2	LA43	0	0	0
R5	T2	COLOM	0	0	0	R10	T2	COLOM	0	0	0
R5	T2	MPI116	1	1	3.5	R10	T2	MPI116	0	0	0
R5	T2	LA43	0	0	0	R10	T2	LA43	0	0	0

R1 T3 COLOM	0	0	0	R6 T3 COLOM	0	0	0
R1 T3 MPI116	0	0	0	R6 T3 MPI116	0	0	0
R1 T3 LA43	0	0	0	R6 T3 LA43	0	0	0
R2 T3 COLOM	0	0	0	R7 T3 COLOM	0	0	0
R2 T3 MPI116	0	0	0	R7 T3 MPI116	0	0	0
R2 T3 LA43	0	0	0	R7 T3 LA43	0	0	0
R3 T3 COLOM	0	0	0	R8 T3 COLOM	0	0	0
R3 T3 MPI116	0	0	0	R8 T3 MPI116	1	2	1.6
R3 T3 LA43	0	0	0	R8 T3 LA43	0	0	0
R4 T3 COLOM	0	0	0	R9 T3 COLOM	0	0	0
R4 T3 MPI116	0	0	0	R9 T3 MPI116	0	0	0
R4 T3 LA43	0	0	0	R9 T3 LA43	0	0	0
R5 T3 COLOM	0	0	0	R10 T3 COLOM	0	0	0
R5 T3 LA43	0	0	0	R10 T3 MPI116	0	0	0
R5 T3 MPI116	1	1	2.2	R10 T3 LA43	0	0	0
R1 T4 COLOM	0	0	0	R6 T4 COLOM	1	1	23.6
R1 T4 MPI116	0	0	0	R6 T4 MPI116	1	1	3.1
R1 T4 LA43	0	0	0	R6 T4 LA43	0	0	0
R2 T4 COLOM	0	0	0	R7 T4 COLOM	1	2	4.2
R2 T4 MPI116	0	0	0	R7 T4 MPI116	0	0	0
R2 T4 LA43	0	0	0	R7 T4 LA43	0	0	0
R3 T4 COLOM	0	0	0	R8 T4 COLOM	0	0	0
R3 T4 MPI116	1	1	1.1	R8 T4 MPI116	0	0	0
R3 T4 LA43	0	0	4	R8 T4 LA43	0	0	0
R4 T4 COLOM	0	0	0	R9 T4 COLOM	0	0	0
R4 T4 MPI116	1	7	4.0	R9 T4 MPI116	1	2	9.6
R4 T4 LA43	0	0	0	R9 T4 LA43	0	0	0
R5 T4 COLOM	1	1	3.5	R10 T4 COLOM	0	0	0
R5 T4 MPI116	0	0	0	R10 T4 MPI116	1	2	1.6
R5 T4 LA43	0	0	0	R10 T4 LA43	0	0	0
R1 T5 COLOM	0	0	0	R6 T5 COLOM	0	0	0
R1 T5 MPI116	0	0	0	R6 T5 MPI116	0	0	0
R1 T5 LA43	0	0	0	R6 T5 LA43	0	0	0
R2 T5 COLOM	0	0	0	R7 T5 COLOM	0	0	0
R2 T5 MPI116	1	1	1.7	R7 T5 MPI116	0	0	0
R2 T5 LA43	0	0	0	R7 T5 LA43	0	0	0
R3 T5 COLOM	0	0	0	R8 T5 COLOM	0	0	0
R3 T5 MPI116	0	0	0	R8 T5 MPI116	0	0	0
R3 T5 LA43	0	0	0	R8 T5 LA43	0	0	0
R4 T5 COLOM	1	4	8.6	R9 T5 COLOM	0	0	0
R4 T5 MPI116	1	8	12.7	R9 T5 MPI116	0	0	0
R4 T5 LA43	0	0	0	R9 T5 LA43	0	0	0
R5 T5 COLOM	0	0	0	R10 T5 COLOM	0	0	0
R5 T5 MPI116	0	0	0	R10 T5 MPI116	0	0	0
R5 T5 LA43	0	0	0	R10 T5 LA43	0	0	0
R1 T6 COLOM	1	6	4.2	R3 T6 COLOM	1	6	13.0
R1 T6 MPI116	1	7	4.4	R3 T6 MPI116	0	0	0
R1 T6 LA43	0	0	0	R3 T6 LA43	0	0	0
R2 T6 COLOM	0	0	0	R4 T6 COLOM	0	0	0
R2 T6 MPI116	1	2	1.4	R4 T6 MPI116	0	0	0
R2 T6 LA43	0	0	0	R4 T6 LA43	0	0	0

R5 T6 COLOM 0 0 0
 R5 T6 MPI116 0 0 0
 R5 T6 LA43 0 0 0

R6 T6 COLOM 0 0 0
 R6 T6 MPI116 0 0 0
 R6 T6 LA43 0 0 0

R7 T6 COLOM 0 0 0
 R7 T6 MPI116 0 0 0
 R7 T6 LA43 0 0 0

R8 T6 COLOM 0 0 0
 R8 T6 MPI116 0 0 0
 R8 T6 LA43 0 0 0

R9 T6 COLOM 0 0 0
 R9 T6 MPI116 0 0 0
 R9 T6 LA43 0 0 0

R10 T6 COLOM 0 0 0
 R10 T6 MPI116 0 0 0
 R10 T6 LA43 0 0 0

R1 T7 COLOM 0 0 0
 R1 T7 MPI116 0 0 0
 R1 T7 LA43 0 0 0

R6 T7 COLOM 0 0 0
 R6 T7 MPI116 0 0 0
 R6 T7 LA43 0 0 0

R2 T7 COLOM 0 0 0
 R2 T7 MPI116 0 0 0
 R2 T7 LA43 0 0 0

R7 T7 COLOM 0 0 0
 R7 T7 MPI116 0 0 0
 R7 T7 LA43 0 0 0

R3 T7 COLOM 0 0 0
 R3 T7 MPI116 0 0 0
 R3 T7 LA43 0 0 0

R8 T7 COLOM 0 0 0
 R8 T7 MPI116 0 0 0
 R8 T7 LA43 0 0 0

R4 T7 COLOM 0 0 0
 R4 T7 MPI116 0 0 0
 R4 T7 LA43 0 0 0

R9 T7 COLOM 1 1 9.8
 R9 T7 MPI116 0 0 0
 R9 T7 LA43 0 0 0

R5 T7 COLOM 0 0 0
 R5 T7 MPI116 1 6 2.4
 R5 T7 LA43 0 0 0

R10 T7 COLOM 0 0 0
 R10 T7 MPI116 0 0 0
 R10 T7 LA43 0 0 0

R1 T8 COLOM 0 0 0
 R1 T8 MPI116 0 0 0
 R1 T8 LA43 0 0 0

R6 T8 COLOM 0 0 0
 R6 T8 MPI116 0 0 0
 R6 T8 LA43 0 0 0

R2 T8 COLOM 0 0 0
 R2 T8 MPI116 1 1 1.6
 R2 T8 LA43 0 0 0

R7 T8 COLOM 0 0 0
 R7 T8 MPI116 0 0 0
 R7 T8 LA43 0 0 0

R3 T8 COLOM 0 0 0
 R3 T8 MPI116 0 0 0
 R3 T8 LA43 0 0 0

R8 T8 COLOM 0 0 0
 R8 T8 MPI116 0 0 0
 R8 T8 LA43 0 0 0

R4 T8 COLOM 1 4 2.8
 R4 T8 MPI116 1 3 3.7
 R4 T8 LA43 0 0 0

R9 T8 COLOM 0 0 0
 R9 T8 MPI116 1 2 1.4
 R9 T8 LA43 0 0 0

R5 T8 COLOM 0 0 0
 R5 T8 MPI116 0 0 0
 R5 T8 LA43 0 0 0

R10 T8 COLOM 0 0 0
 R10 T8 MPI116 1 5 2.7
 R10 T8 LA43 0 0 0

R1 T9 COLOM 0 0 0
 R1 T9 MPI116 1 1 3.1
 R1 T9 LA43 0 0 0

R5 T9 COLOM 0 0 0
 R5 T9 MPI116 1 6 2.0
 R5 T9 LA43 0 0 0

R2 T9 COLOM 0 0 0
 R2 T9 MPI116 0 0 0
 R2 T9 LA43 0 0 0

R6 T9 COLOM 1 2 2.1
 R6 T9 MPI116 1 2 0.8
 R6 T9 LA43 0 0 0

R3 T9 COLOM 0 0 0
 R3 T9 MPI116 0 0 0
 R3 T9 LA43 0 0 0

R7 T9 COLOM 0 0 0
 R7 T9 MPI116 0 0 0
 R7 T9 LA43 0 0 0

R4 T9 COLOM 0 0 0
 R4 T9 MPI116 1 1 1.7
 R4 T9 LA43 0 0 0

R8 T9 COLOM 0 0 0
 R8 T9 MPI116 1 12 9.3
 R8 T9 LA43 0 0 0

R9 T9 COLOM	0	0	0	R10 T9 COLOM	1	2	1.6
R9 T9 MPI116	1	3	4.9	R10 T9 MPI116	0	0	0
R9 T9 LA43	0	0	0	R10 T9 LA43	0	0	0
R1 T10 COLOM	0	0	0	R6 T10 COLOM	0	0	0
R1 T10 MPI116	0	0	0	R6 T10 MPI116	0	0	0
R1 T10 LA43	0	0	0	R6 T10 LA43	0	0	0
R2 T10 COLOM	0	0	0	R7 T10 COLOM	0	0	0
R2 T10 MPI116	1	4	1.4	R7 T10 MPI116	1	1	1.5
R2 T10 LA43	0	0	0	R7 T10 LA43	0	0	0
R3 T10 COLOM	0	0	0	R8 T10 COLOM	0	0	0
R3 T10 MPI116	1	8	7.5	R8 T10 MPI116	0	0	0
R3 T10 LA43	0	0	0	R8 T10 LA43	0	0	0
R4 T10 COLOM	1	5	2.4	R9 T10 COLOM	0	0	0
R4 T10 MPI116	0	0	0	R9 T10 MPI116	0	0	0
R4 T10 LA43	0	0	0	R9 T10 LA43	0	0	0
R5 T10 COLOM	0	0	0	R10 T10 COLOM	0	0	0
R5 T10 MPI116	0	0	0	R10 T10 MPI116	0	0	0
R5 T10 LA43	0	0	0	R10 T10 LA43	0	0	0
R1 T11 COLOM	0	0	0	R1 T12 COLOM	0	0	0
R1 T11 MPI116	0	0	0	R1 T12 MPI116	0	0	0
R1 T11 LA43	1	3	3.4	R1 T12 LA43	0	0	0
R2 T11 COLOM	0	0	0	R2 T12 COLOM	0	0	0
R2 T11 MPI116	1	5	8.5	R2 T12 MPI116	0	0	0
R2 T11 LA43	1	6	5.2	R2 T12 LA43	0	0	0
R3 T11 COLOM	0	0	0	R3 T12 COLOM	1	8	6.6
R3 T11 MPI116	0	0	0	R3 T12 MPI116	1	7	3.2
R3 T11 LA43	1	1	4.2	R3 T12 LA43	0	0	0
R4 T11 COLOM	1	3	5.5	R4 T12 COLOM	0	0	0
R4 T11 MPI116	1	3	4.2	R4 T12 MPI116	1	4	4.5
R4 T11 LA43	1	4	1.0	R4 T12 LA43	0	0	0
R5 T11 COLOM	1	4	6.3	R5 T12 COLOM	1	4	1.8
R5 T11 MPI116	1	2	2.6	R5 T12 MPI116	1	3	3.0
R5 T11 LA43	1	4	3.7	R5 T12 LA43	0	0	0
R6 T11 COLOM	0	0	0	R6 T12 COLOM	0	0	0
R6 T11 MPI116	1	8	8.8	R6 T12 MPI116	0	0	0
R6 T11 LA43	0	0	0	R6 T12 LA43	0	0	0
R7 T11 COLOM	1	3	0.8	R7 T12 COLOM	0	0	0
R7 T11 MPI116	1	3	10.8	R7 T12 MPI116	1	4	3.2
R7 T11 LA43	0	0	0	R7 T12 LA43	0	0	0
R8 T11 COLOM	0	0	0	R8 T12 COLOM	0	0	0
R8 T11 MPI116	1	2	3.2	R8 T12 MPI116	1	6	3.1
R8 T11 LA43	0	0	0	R8 T12 LA43	0	0	0
R9 T11 COLOM	0	0	0	R9 T12 COLOM	0	0	0
R9 T11 MPI116	0	0	0	R9 T12 MPI116	1	1	5.1
R9 T11 LA43	0	0	0	R9 T12 LA43	1	1	1.2
R10 T11 COLOM	0	0	0	R10 T12 COLOM	0	0	0
R10 T11 MPI116	0	0	0	R10 T12 MPI116	1	2	6.7
R10 T11 LA43	0	0	0	R10 T12 LA43	0	0	0
R1 T13 COLOM	0	0	0	R2 T13 COLOM	0	0	0
R1 T13 MPI116	1	5	10.1	R2 T13 MPI116	1	4	8.9
R1 T13 LA43	0	0	0	R2 T13 LA43	0	0	0

R3 T13 COLOM	0	0	0	R7 T13 COLOM	0	0	0
R3 T13 MPI116	1	1	1.3	R7 T13 MPI116	0	0	0
R3 T13 LA43	0	0	0	R7 T13 LA43	0	0	0
R4 T13 COLOM	0	0	0	R8 T13 COLOM	0	0	0
R4 T13 MPI116	1	6	2.4	R8 T13 MPI116	1	6	3.4
R4 T13 LA43	0	0	0	R8 T13 LA43	0	0	0
R5 T13 COLOM	0	0	0	R9 T13 COLOM	0	0	0
R5 T13 MPI116	0	0	0	R9 T13 MPI116	0	0	0
R5 T13 LA43	0	0	0	R9 T13 LA43	0	0	0
R6 T13 COLOM	0	0	0	R10 T13 COLOM	0	0	0
R6 T13 MPI116	0	0	0	R10 T13 MPI116	1	7	7.0
R6 T13 LA43	0	0	0	R10 T13 LA43	0	0	0
R1 T14 COLOM	0	0	0	R6 T14 COLOM	1	3	0.9
R1 T14 MPI116	0	0	0	R6 T14 MPI116	0	0	0
R1 T14 LA43	0	0	0	R6 T14 LA43	0	0	0
R2 T14 COLOM	0	0	0	R7 T14 COLOM	0	0	0
R2 T14 MPI116	1	9	4.4	R7 T14 MPI116	0	0	0
R2 T14 LA43	0	0	0	R7 T14 LA43	0	0	0
R3 T14 COLOM	0	0	0	R8 T14 COLOM	0	0	0
R3 T14 MPI116	0	0	0	R8 T14 MPI116	0	0	0
R3 T14 LA43	0	0	0	R8 T14 LA43	0	0	0
R4 T14 COLOM	0	0	0	R9 T14 COLOM	0	0	0
R4 T14 MPI116	0	0	0	R9 T14 MPI116	0	0	0
R4 T14 LA43	0	0	0	R9 T14 LA43	0	0	0
R5 T14 COLOM	0	0	0	R10 T14 COLOM	0	0	0
R5 T14 MPI116	0	0	0	R10 T14 MPI116	0	0	0
R5 T14 LA43	0	0	0	R10 T14 LA43	0	0	0
R1 T15 COLOM	0	0	0	R6 T15 COLOM	1	6	11.7
R1 T15 MPI116	0	0	0	R6 15MPI116	1	1	3.5
R1 T15 LA43	0	0	0	R6 T15 LA43	0	0	0
R2 T15 COLOM	1	3	8.0	7 T15 COLOM	0	0	0
R2 T15 MPI116	0	0	0	R7 T15 MPI116	0	0	0
R2 T15 LA43	0	0	0	R7 T15 LA43	0	0	0
R3 T15 COLOM	0	0	0	R8 T15 COLOM	0	0	0
R3 T15 MPI116	0	0	0	R8 T15 MPI116	0	0	0
R3 T15 LA43	0	0	0	R8 T15 LA43	0	0	0
R4 T15 COLOM	0	0	0	R9 T15 COLOM	0	0	0
R4 T15 MPI116	0	0	0	R9 T15 MPI116	0	0	0
R4 T15 LA43	0	0	0	R9 T15 LA43	0	0	0
R5 T15 COLOM	0	0	0	R10 T15 COLOM	0	0	0
R5 T15 MPI116	1	2	4.6	R10 T15 MPI116	0	0	0
R5 T15 LA43	1	1	2.6	R10 T15 LA43	0	0	0
R1 T16 COLOM	0	0	0	R4 T16 COLOM	0	0	0
R1 T16 MPI116	1	2	0.6	R4 T16 MPI116	1	8	4.5
R1 T16 LA43	0	0	0	R4 T16 LA43	0	0	0
R2 T16 COLOM	0	0	0	R5 T16 COLOM	0	0	0
R2 T16 MPI116	1	1	1.1	R5 T16 MPI116	0	0	0
R2 T16 LA43	0	0	0	R5 T16 LA43	0	0	0
R3 T16 COLOM	0	0	0	R6 T16 COLOM	0	0	0
R3 T16 MPI116	1	2	2.4	R6 T16 MPI116	0	0	0
R3 T16 LA43	0	0	0	R6 T16 LA43	0	0	0

R7 T16 COLOM	0	0	0	R9 T16 COLOM	0	0	0
R7 T16 MPI116	0	0	0	R9 T16 MPI116	0	0	0
R7 T16 LA43	0	0	0	R9 T16 LA43	0	0	0
R8 T16 COLOM	0	0	0	R10 T16 COLOM	0	0	0
R8 T16 MPI116	0	0	0	R10 T16 MPI116	0	0	0
R8 T16 LA43	0	0	0	R10 T16 LA43	0	0	0
R1 T17 COLOM	0	0	0	R6 T17 COLOM	1	6	3.0
R1 T17 MPI116	0	0	0	R6 T17 MPI116	1	1	0.5
R1 T17 LA43	0	0	0	R6 T17 LA43	0	0	0
R2 T17 COLOM	0	0	0	R7 T17 COLOM	0	0	0
R2 T17 MPI116	1	9	3.5	R7 T17 MPI116	0	0	0
R2 T17 LA43	0	0	0	R7 T17 LA43	0	0	0
R3 T17 COLOM	0	0	0	R8 T17 COLOM	0	0	0
R3 T17 MPI116	0	0	0	R8 T17 MPI116	0	0	0
R3 T17 LA43	0	0	0	R8 T17 LA43	0	0	0
R4 T17 COLOM	0	0	0	R9 T17 COLOM	0	0	0
R4 T17 MPI116	1	2	1.8	R9 T17 MPI116	0	0	0
R4 T17 LA43	0	0	0	R9 T17 LA43	0	0	0
R5 T17 COLOM	1	3	2.3	R10 T17 COLOM	0	0	0
R5 T17 MPI116	0	0	0	R10 T17 MPI116	0	0	0
R5 T17 LA43	0	0	0	R10 T17 LA43	0	0	0
R1 T18 COLOM	0	0	0	R6 T18 COLOM	0	0	0
R1 T18 MPI116	1	1	2.2	R6 T18 MPI116	1	1	1.0
R1 T18 LA43	0	0	0	R6 T18 LA43	0	0	0
R2 T18 COLOM	0	0	0	R7 T18 COLOM	1	2	2.0
R2 T18 MPI116	1	4	7.2	R7 T18 MPI116	0	0	0
R2 T18 LA43	0	0	0	R7 T18 LA43	0	0	0
R3 T18 COLOM	0	0	0	R8 T18 COLOM	0	0	0
R3 T18 MPI116	0	0	0	R8 T18 MPI116	1	1	1.0
R3 T18 LA43	0	0	0	R8 T18 LA43	0	0	0
R4 T18 COLOM	1	1	2.0	R9 T18 COLOM	0	0	0
R4 T18 MPI116	1	1	0.8	R9 T18 MPI116	1	1	1.0
R4 T18 LA43	0	0	0	R9 T18 LA43	0	0	0
R5 T18 COLOM	0	0	0	R10 T18 COLOM	0	0	0
R5 T18 MPI116	1	7	5.1	R10 T18 MPI116	1	3	1.7
R5 T18 LA43	0	0	0	R10 T18 LA43	0	0	0

REFERENCIAS:

REP	=	Repetición
TRA	=	Tratamiento
GENOT	=	Genotipo
P V	=	Plantas verdes
N B	=	Número de brotes
L B	=	Longitud de brotes



FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGRONOMICAS

LA TESIS TITULADA: "EFECTO DE LA CINETINA (CIN), BENCILAMINOPURINA (BAP) Y ACIDO NAFTALENACETICO (ANA), SOBRE LA REGENERACION DE PLANTAS IN VITRO, A PARTIR DE TEJIDO NO DIFERENCIADO DE ARROZ (Oryza sativa L.)"

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: WILLIAM ROLANDO SANCHEZ PEREZ

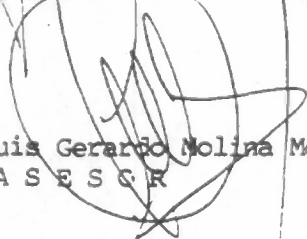
CARNET No: 9316578

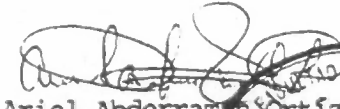
HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Estuardo Roca Canet
Ing. Agr. Francisco Javier Vásquez Vásquez
Ing. Agr. Walter Arnoldo Reyes Sanabria

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


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


Ing. Agr. M.Sc. Héctor Alfredo Sagastume Mena
A S E S O R


Ing. Agr. Luis Gerardo Molina Monterroso
A S E S O R


Dr. Ariel Abderramán Ortiz López
DIRECCION DEL IIA:
DIRECCION



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.
Archivo
AO/prr.

APARTADO POSTAL 1545 § 01091 GUATEMALA, C.A.
TEL/FAX (502) 476-9794

e-mail: llusac.edu.gt § <http://www.usac.edu.gt/facultades/agronomia.htm>